

**Biosynthese der reduktiven Tetrachlorethen-  
Dehalogenase in *Desulfitobacterium hafniense* Y51 in  
Abhängigkeit vom Enzysubstrat und dem  
Corrinoid-Cofaktor**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Diplom-Biologin Anika Reinhold

geboren am 10.10.1984 in Gera

1. Gutachter      Prof. Dr. Gabriele Diekert (Universität Jena)
2. Gutachter      Prof. Dr. Erika Kothe (Universität Jena)
3. Gutachter      PD Dr. Lorenz Adrian (Umweltforschungszentrum Leipzig)

Tag der öffentlichen Disputation:      28. August 2013

## Inhalt

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	I
<b>Zusammenfassung</b>	II
<b>1. Einleitung</b>	1
1.1 Bedeutung chlorierter organischer Verbindungen	1
1.2 Abbau chlorierter organischer Verbindungen	2
1.3 Dehalogenierende Mikroorganismen	4
1.4 Reduktive Tetrachlorethen-Dehalogenase	6
1.5 Regulation der reduktiven Dechlorierung	12
1.6 Zielstellung	13
<b>2. Material und Methoden</b>	14
2.1 Mikroorganismen und Materialien	14
2.2 Kultivierung der Mikroorganismen	15
2.3 Reinigung der PceA-Aggregate	17
2.4 Extraktion von Corrinoïden	20
2.5 Analytische Methoden	22
2.6 Proteinbiochemische Methoden	24
2.7 Molekularbiologische Methoden	29
2.8 Elektronenmikroskopische Methoden	38
2.9 Bioinformatische Methoden	40
<b>3. Ergebnisse</b>	41
3.1 Aggregation der PCE-Dehalogenase (PceA) in Abwesenheit von PCE	41
3.1.1 Isolierung der PceA-Aggregate	45
3.1.2 Charakterisierung der PceA-Aggregate	49
3.2 Untersuchung der Corrinoïd-Biosynthese in <i>D. hafniense</i> Y51	54
3.2.1 Einfluss externer Corrinoïd-Quellen	54
3.2.2 Einfluss von Tetrachlorethen	59
3.3 Einfluss exogener Faktoren auf die PCE-Dehalogenase	62
3.3.1 Vitamin B <sub>12</sub>	62
3.3.1.1 Synthese und Lokalisation der PCE-Dehalogenase	62
3.3.1.2 Stabilität und Expression des <i>pce</i> -Genclusters	65

3.3.2	Tetrachlorethen .....	68
3.3.2.1	Isolierung konstant dechlorierender Varianten .....	69
3.3.2.2	Induktion und Stabilität der dechlorierenden Aktivität .....	71
3.3.2.3	Molekularbiologische Analyse der Varianten von <i>D. hafniense</i> Y51 .....	75
3.4	Interaktion der PCE-Dehalogenase mit dem mutmaßlichen Membrananker PceB .....	77
3.4.1	Der mutmaßliche Membrananker PceB .....	77
3.4.2	Studien zur Interaktion der PCE-Dehalogenase mit PceB .....	85
4.	<b>Diskussion</b> .....	89
5.	<b>Literatur</b> .....	100
	<b>Anhang</b> .....	i
	<b>Danksagung</b> .....	vii
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b> .....	viii
	<b>Curriculum Vitae</b> .....	ix
	<b>Wissenschaftliche Veröffentlichungen</b> .....	x



## Abkürzungsverzeichnis

APS	<u>A</u> mmoniumpersulfat
cDCE	<i>cis</i> -1,2- <u>D</u> ichlorethen
cDNA	<u>c</u> omplementary <u>D</u> N <u>A</u> / komplementäre DNA
Cy	<u>C</u> ytoplasma
D	<u>D</u> eutschland
dNTP	<u>D</u> esoxyribonukleosidtriphosphat
DMB	5,6- <u>D</u> imethylbenzimidazol
DNA	<u>d</u> eoxyribonucleic <u>a</u> cid/ Desoxyribonukleinsäure
DSYxxxx	Locus_ <u>T</u> ag
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraacetat
EF	exoplasmatische Seite der Cytoplasmamembran
FRIL	<u>F</u> reeze- <u>F</u> racture <u>R</u> eplica <u>I</u> mmunogold <u>L</u> abeling
GRAVY	<u>g</u> rand <u>a</u> verage of hydrophobicity
HPLC	<u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography
HSP	<u>H</u> itzeschockproteine
LC-MS/MS	liquid chromatography <u>m</u> ass spectrometry / <u>m</u> ass spectrometry
LD	<u>L</u> arge <u>D</u> eletion
LZK	<u>L</u> angzeitkultivierung
OD	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte
PAGE	<u>P</u> olyacrylamid- <u>G</u> elelektrophorese
PCE	<u>P</u> erchlorethen, Tetrachlorethen
PCR	<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction/Polymerasekettenreaktion
PceA	gereifte/ mature Form der PCE-Dehalogenase
PBS(T)	<u>P</u> hosphate- <u>B</u> uffered <u>S</u> aline ( <u>T</u> ween)
PF	protoplasmatische Seite der Cytoplasmamembran
präPceA	unprozessierte Form der PCE-Dehalogenase
PVDF	<u>P</u> olyvinyliden <u>d</u> ifluorid
qRT-PCR	<u>Q</u> uantitative <u>R</u> everse <u>T</u> ranskriptase- <u>P</u> CR
RNA	<u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid / Ribonukleinsäure
RT-PCR	<u>R</u> everse <u>T</u> ranskriptase- <u>P</u> CR
SDS	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulphate / Natriumdodecylsulfat
SSC	<u>S</u> aline- <u>S</u> odium- <u>C</u> itrate
Tat	<u>T</u> win <u>A</u> rginine <u>T</u> ranslocation
TCA	<u>T</u> richloracetat / Trichloressigsäure
TCE	<u>T</u> richlorethen
TEMED	N,N,N',N'- <u>T</u> etramethylethylendi <u>a</u> min
v/v	volume per volume
WHO	<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganisation
w/v	weight per volume

### Weitere Begriffserklärungen

Vitamin B <sub>12</sub>	Cyanocobalamin
Coenzym B <sub>12</sub>	Adenosylcobalamin

## Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Prozess der reduktiven Dechlorierung von Tetrachlorethen (PCE) im gram-positiven, strikt anaeroben Bakterium *Desulfitobacterium hafniense* Y51 in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von PCE bzw. externem Vitamin B<sub>12</sub> (Cyanocobalamin) untersucht. Der Abbau von PCE zu *cis*-Dichlorethen (cDCE) erfolgt durch die reduktive Tetrachlorethen-Dehalogenase (PCE-Dehalogenase, PceA). Das *pceA*-Gen ist im *pceABCT*-Gencluster kodiert, welcher Teil eines mobilen genetischen Elements (Transposon) ist. PceA bindet zwei Eisen-Schwefel-Cluster und einen Corrinoide-Cofaktor. Der Einbau aller Cofaktoren in PceA ist vermutlich eine notwendige Voraussetzung für den „twin arginine translocation“ (Tat)-abhängigen Transport des Proteins über die Cytoplasmamembran.

Die in Abwesenheit von PCE auftretende Aggregation von unprozessiertem inaktivem PceA im Cytoplasma der Zellen beruhte vermutlich auf einem Mangel an Corrinoide-Cofaktor. In dieser Arbeit wurde die Bildung von Aggregaten ebenfalls für das mutmaßliche Faltungshelferprotein PceT beobachtet. Die Analyse der gereinigten Proteinaggregate ergab, dass neben PceA und PceT auch Proteine der Protein- bzw. Corrinoide-Biosynthese vorhanden sind.

Der häufig beobachtete Verlust von PceA-Protein und PceA-Aktivität bei Subkultivierung von *D. hafniense* Y51 in Abwesenheit von PCE konnte auf die vollständige Transposition des *pce*-Genclusters zurückgeführt werden. Eine Verzögerung des Prozesses wurde durch Zugabe von Cyanocobalamin zum Medium bewirkt. Die Isolierung einer vermutlich konstitutiv dechlorierenden Variante von *D. hafniense* Y51 war erfolgreich.

Die durchgeführten Untersuchungen zur *de novo* Corrinoide-Biosynthese ergaben, dass die Zusammensetzung der Corrinoide der Zellen durch externe Faktoren wie die Verfügbarkeit von PCE, die Zugabe von Adenosylcobalamin oder 5,6-Dimethylbenzimidazol zum Medium beeinflusst werden kann.

In dieser Arbeit konnte erstmalig die Bildung des mutmaßlichen Membrananker-Proteins PceB *in vivo* und dessen membran-assoziierte Lokalisation gezeigt werden. Zudem wurden mittels Far-Western-Blot Analysen erste Hinweise für eine Interaktion von PceA und dem exoplasmatischen Loop von PceB erhalten.

Abschließend wurde unter Verwendung aller bisherigen Erkenntnisse ein Modell über die Bildung und Reifung von PceA in *D. hafniense* Y51 in Abhängigkeit von PCE und Vitamin B<sub>12</sub> erstellt.

## Summary

In the work presented here, the process of the reductive dechlorination of tetrachloroethene (PCE) mediated by the gram-positive, strictly anaerobic bacterium *Desulfitobacterium hafniense* Y51 was investigated in dependence on the availability of PCE and external vitamin B<sub>12</sub> (cyanocobalamin), respectively. The degradation of PCE to *cis*-dichloroethene (*c*DCE) is catalyzed by the reductive tetrachloroethene dehalogenase (PCE dehalogenase, PceA). The *pceA* gene is located in the *pceABCT* gene cluster, which is part of a mobile genetic element (transposon). PceA harbors two iron-sulfur clusters and one corrinoid cofactor. The incorporation of all cofactors into PceA seemed to be necessary for a transport of the protein across the cytoplasmic membrane via the “twin arginine translocation” (tat) - pathway.

In the absence of PCE the observed aggregation of unprocessed and inactive PceA protein in the cytoplasm of the cells is probably due to the lack of corrinoid cofactor. In this work, the formation of aggregates was also observed for the mutmaßliche chaperon protein PceT. The analysis of purified protein aggregates revealed beside PceA and PceT the presence of proteins involved in the biosynthesis of proteins and corrinoids, respectively.

The frequently observed loss of PceA protein and PceA activity during sub-cultivation of *D. hafniense* Y51 in the absence of PCE was ascribed to the complete transposition of the *pce* gene cluster. This process was delayed in the presence of external vitamin B<sub>12</sub>. Furthermore, it was possible to isolate a probably constitutively dechlorinating variant of *D. hafniense* Y51.

Studies on the *de novo* corrinoid biosynthesis revealed that the composition of corrinoids in the cells can be affected by external factors like the availability of PCE, the addition of adenosylcobalamin or 5,6-dimethylbenzimidazole to the medium.

In this work, the *in vivo* formation of the mutmaßliche membrane anchor protein PceB and its membrane-associated localization was shown for the first time. Moreover, initial indications for an interaction of PceA and the exoplasmic loop of the PceB protein were obtained via far western blot analysis.

Finally, according to the present knowledge a model on the formation and maturation of the PceA protein in *D. hafniense* Y51 in dependence on the availability of vitamin B<sub>12</sub> and PCE was developed.

# 1. Einleitung

## 1.1 Bedeutung chlorierter organischer Verbindungen

Halogenierte organische Verbindungen kommen in der Natur ubiquitär vor. Sie sind häufig natürlichen Ursprungs und entstehen durch biotische bzw. abiotische Prozesse. Derzeit sind mehr als 5000 halogenierte Verbindungen mit natürlichem Ursprung bekannt (Gribble 2003, Gribble 2012). Die meisten dieser Verbindungen lassen sich in marinen Pflanzen, z. B. Rotalgen bzw. Blaugrüne Algen (z. B. *Asparagopsis taxiformis*, *Lyngbya majuscula*), aber auch in marinen Tieren (z. B. Seescheiden, Schwämme) nachweisen. Diese produzieren hauptsächlich bromierte Verbindungen (z. B. Bromoform), welche vermutlich zur chemischen Abwehr von Fraßfeinden verwendet werden (Gribble 1998, Gribble 2003). Im Gegensatz zu marinen Organismen bilden terrestrische Pflanzen, Tiere, Insekten, Pilze und Bakterien überwiegend chlorierte Verbindungen (Gribble 1998). Diese fungieren unter anderem als Wachstumshormone (z. B. 4-Chlorindol-3-Essigsäure), Sexualhormone (z. B. 2,6-Dichlorphenol) oder antimikrobiell wirksame Metabolite wie z. B. Chloramphenicol oder Griseofulvin (Gribble 1998, Gribble 2003). Neben den genannten biotischen Quellen sind auch viele abiotische Prozesse für die Bildung von halogenierten organischen Verbindungen verantwortlich. Sowohl durch Vulkanausbrüche als auch durch Wald- und Buschbrände werden unter anderem Methylchlorid, Brommethan, jodierte Verbindungen, aber auch polychlorierte Dibenzodioxine oder Dibenzofurane freigesetzt (Rasmussen et al. 1982, Gribble 2003). In den letzten Jahrzehnten ist durch die Industrialisierung die Bedeutung anthropogener Quellen für halogenierte organische Verbindungen stetig gestiegen. Durch den Einsatz von Pestiziden in der Landwirtschaft (z. B.  $\gamma$ -Hexachlorcyclohexan „Lindan“) sowie die Nutzung von Lösungsmitteln (z. B. Tetrachlorethen) und Industriechemikalien (z. B. polychlorierte Biphenyle, Dioxine) reicherten sich chlorierte organische Verbindungen im Grundwasser, in der Atmosphäre und auch in der Nahrungskette an. Daraufhin wurde die Herstellung vieler dieser Verbindungen aufgrund ihrer Toxizität und Persistenz in der Umwelt im Rahmen der Stockholmer Konvention untersagt (Stockholmer Konvention 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde besonderes Augenmerk auf Tetrachlorethen (Perchlorethen, PCE) gelegt, da es eine der häufigsten Kontaminationen des Grundwassers darstellt (Fetzner 1998).

### *Tetrachlorethen*

PCE ist eine nicht brennbare, flüchtige Substanz, die der Stoffgruppe der leichtflüchtigen halogenierten Kohlenwasserstoffe (LHKW) zugeordnet wird (Bayrisches Landesamt für Umweltschutz; BayLfU 2004). Neben der industriellen Herstellung und Verwendung von PCE existieren auch natürliche Quellen. So ließ sich in der Rotalge *Asparagopsis taxiformis* die Bildung von Tetrachlorethen (PCE; bis zu  $8,2 \text{ ng g}^{-1}$  Feuchtgewicht  $\text{h}^{-1}$ ) und Trichlorethen (TCE; bis zu  $3,4 \text{ mg g}^{-1}$  Feuchtgewicht  $\text{h}^{-1}$ ) zeigen (Abrahamsson et al. 1995). Aufgrund der entfettenden Wirkung findet PCE Anwendung als Lösungsmittel in der chemischen Reinigung, der Metallindustrie und Optik (WHO 2006). In den USA wurden 1998 bis zu 160.000 Tonnen PCE produziert, in der EU im Jahr 1994 100.000 - 200.000 Tonnen (WHO 2006). PCE ist persistent und kann sich im Boden und im Grundwasser anreichern. Laut Trinkwasserverordnung (TrinkwV 2011) liegt der Grenzwert bei  $10 \text{ }\mu\text{g}$  pro Liter Wasser. An belasteten Standorten konnten bis zu  $1000 \text{ }\mu\text{g}$  pro Liter nachgewiesen werden (WHO 2006). PCE besitzt eine gute Fettlöslichkeit, weshalb es sich, nach Aufnahme in den Körper, im Fettgewebe anreichert. Die Aufnahme kann über die Nahrung, das Trinkwasser oder die Luft erfolgen. Es wird geschätzt, dass täglich  $0,5 - 3 \text{ }\mu\text{g}$  pro kg Körpergewicht aufgenommen werden, wobei die maximale tolerierbare Menge bei  $50 \text{ }\mu\text{g}$  pro kg Körpergewicht liegt (WHO 2006). Ist ein menschlicher Organismus hohen PCE-Konzentrationen ausgesetzt, kann es zu Leber- und Nierenschäden kommen (Agency for Toxic Substances and Disease Registry; ATSDR 2007). Auch Störungen des Zentralnervensystems sind möglich (Gefahrenstoffinformationssystem; GESTIS 2012). Zudem kann eine kanzerogene Wirkung nicht ausgeschlossen werden (WHO 2006).

## **1.2 Abbau chlorierter organischer Verbindungen**

Der Abbau halogener organischer Verbindungen kann durch abiotische Prozesse erfolgen. Dieser spielt im Vergleich zu den biotischen Prozessen eine untergeordnete Rolle, ist aber dort von Bedeutung, wo die biotische Dehalogenierung limitiert ist (Tobiszewski et al. 2012). Interessanterweise kann unter reduktiven Bedingungen ein abiotischer Abbau von halogenierten Verbindungen durch Metallionen bzw. Metallkomplexe erfolgen. Dabei sind Metalle wie Kobalt (z. B. im Vitamin  $\text{B}_{12}$ ), Nickel oder auch Eisen von großer Bedeutung (Tobiszewski et al. 2012, Vogel et al. 1987). Auf diese Weise konnte der Abbau chlorierter organischer Verbindungen durch Inkubation mit eisenhaltigen Mineralien (z. B. Pyrit, Magnetit) oder chemisch gebundenen Eisenionen bewirkt werden (Brown et al. 2006, Ferrey et al. 2004, Kriegman-King et al. 1994, Matheson et al. 1994). Auch die Verwendung von

nullwertigem Eisen ( $\text{Fe}^0$ ) führte zu einer vollständigen reduktiven Dechlorierung von Trichlorethen (TCE) zu Ethen (Gillham et al. 1994, Tobiszewski et al. 2012). Daneben existieren auch oxidative Prozesse in denen chlorierte organische Verbindungen, z. B. durch UV-Strahlung oder Ozon, in nicht oder weniger chlorierte Verbindungen umgewandelt werden können (Kao et al. 2007).

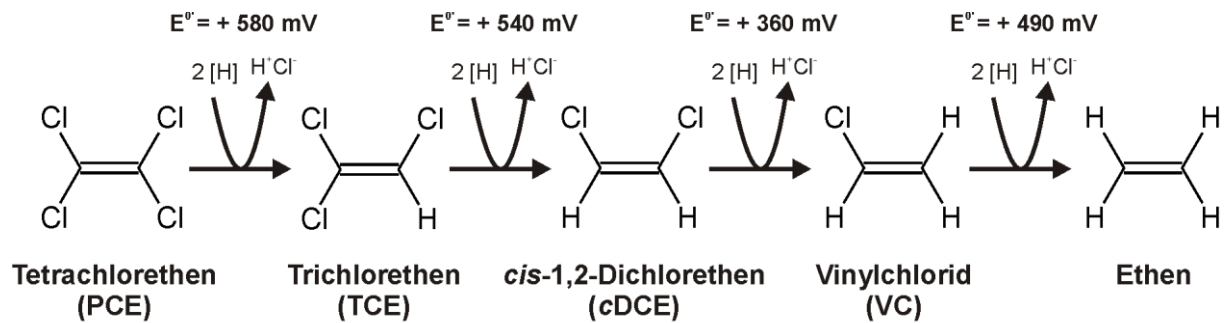
Auf Grund des natürlichen Vorkommens halogener organischer Verbindungen haben sich zudem diverse biotische mikrobielle Systeme für deren Abbau entwickelt. Niedrigchlorierte Verbindungen wie *cis*-1,2-Dichlorethen oder Vinylchlorid können unter aeroben Bedingungen im Rahmen einer oxidativen Dehalogenierung durch Monooxygenasen (z. B. Methanmonooxygenase) bzw. Dioxygenasen (z. B. Toluol-2,3-Dioxygenase) co-metabolisch abgebaut werden (Fetzner 1998). Höherchlorierte Verbindungen wie z. B. polychlorierte Biphenyle oder Tetrachlorethen sind unter aeroben Bedingungen persistent. Für Tetrachlorethen konnte unter aeroben Bedingungen weder ein signifikanter abiotischer noch biotischer Abbau nachgewiesen werden (Fogel et al. 1986, Vanelli et al. 1990).

#### *Abbau von Tetrachlorethen*

Der Abbau von Tetrachlorethen erfolgt durch Mikroorganismen unter anaeroben Bedingungen im Rahmen der reduktiven Dechlorierung. Aufgrund des stark positiven Redoxpotentials stellen PCE und dessen Dechlorierungsprodukte sehr gute Elektronenakzeptoren dar (Abb. 1-1, Vogel et al. 1987). So können während der reduktiven Dechlorierung Werte für die Freie (Gibbs'sche) Energie ( $\Delta G^0$ ) von -130 bis -180 kJ/mol pro entfernten Chloridion erhalten werden (Dolfing 2003). Ist die reduktive Dechlorierung an Energiegewinnung über Elektronentransportphosphorylierung (ETP) gekoppelt, so wird der Prozess als Dehalorespiration (Holliger et al. 1999) bzw. Organohalid-Respiration bezeichnet. Diese Form der anaeroben Atmung ließ sich bei *Dehalococcoides mccartyi*, *Dehalobacter restrictus* oder *Sulfurospirillum multivorans* bei der reduktiven Dechlorierung von PCE nachweisen (Holliger et al. 1998, Maillard et al. 2003, Neumann et al. 1996).

Der anaerobe Abbau von PCE resultiert in der Bildung niedrigchlorierter Verbindungen wie zum Beispiel *cis*-1,2-Dichlorethen oder Vinylchlorid (Abb. 1-1; Futagami et al. 2008). Diese können anschließend durch aerobe Abbauprozesse weiter abgebaut werden. Unter Fe(III)-reduzierenden Bedingungen kann für Vinylchlorid zudem eine vollständige Mineralisierung zu Kohlendioxid durch anaerobe Oxidation erfolgen (Bradley et al. 1996). Eine komplette Dechlorierung von PCE zu Ethen unter anaeroben Bedingungen konnte erstmals für *Dehalococcoides mccartyi* Stamm 195 nachgewiesen werden (Maymó-

Gatell et al.1997). Die Umsetzung von PCE zu Vinylchlorid erfolgt hierbei unter Energiegewinn, der Abbau zu Ethen hingegen co-metabolisch (Maymó-Gatell et al. 1999). Eine Kopplung aller Stufen der Dechlorierung von PCE an Energiekonservierung konnte für *Dehalococcoides* sp. BTF08 gezeigt werden (Cichocka et al. 2010).



**Abbildung 1-1:** Vollständige Dechlorierung von Tetrachlorethen zu Ethen durch anaerobe reduktive Dechlorierung. Die Angabe der Redoxpotentiale ( $E^\circ$ ) basiert auf Vogel et al. 1987.

### 1.3 Dehalogenierende Mikroorganismen

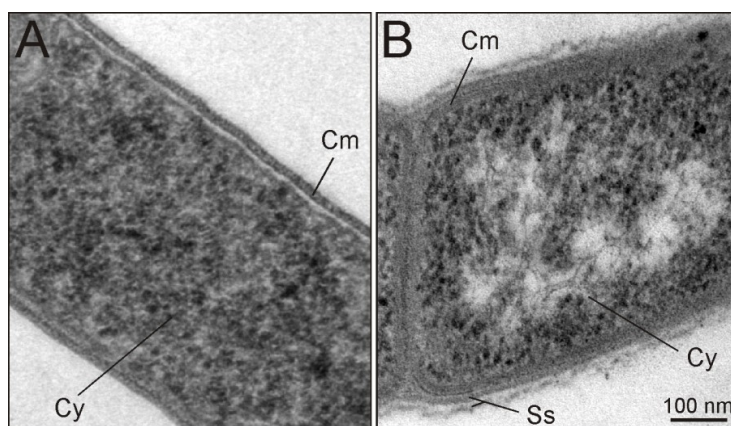
Im Laufe der Evolution entstanden in allen phylogenetischen Reichen (Bacteria, Archaea, Eukarya) zur Dehalogenierung befähigte Mikroorganismen. Ihre Lebensweise kann zwischen aerob, fakultativ anaerob oder strikt anaerob variieren. Aerobe dehalogenierende Mikroorganismen findet man unter anderem in der Gattung *Pseudomonas*, bei Mykobakterien oder methylotrophen Bakterien. Zu den fakultativen, nitratreduzierenden Mikroorganismen zählt zum Beispiel *Pseudomonas stutzeri* (Bossert et al. 2003). Die Gruppe der strikten Anaerobier umfasst Bakterien wie *Desulfitobacterium hafniense*, *Dehalococcoides mccartyi* oder auch *Dehalobacter restrictus*.

Dechlorierende Mikroorganismen lassen sich in 4 phylogenetische Klassen einordnen. Während der Klasse Chloroflexi die Gattung *Dehalococcoides* spec. zugeordnet wird, findet man in der Klasse der  $\delta$ -Proteobacteria Organismen wie *Anaeromyxobacter dehalogenans*, *Geobacter lovleyi*, *Desulfuromonas* spec. oder auch *Desulfomonile* spec. (deWeerd et al. 1990, Sanford et al. 2002, Sung et al. 2003, Sung et al. 2006). *Sulfurospirillum multivorans* wird der Klasse der  $\epsilon$ -Proteobacteria zugeordnet (Scholz-Muramatsu et al. 1995). In der Klasse der Gram-positiven mit niedrigem GC-Gehalt findet man Gattungen wie *Dehalobacter* spec. oder *Desulfitobacterium* spec., welche reduktiv dehalogenierende Arten enthalten (Smidt et al. 2004).

Desulfitobakterien wurden wiederholt aus mit halogenierten Verbindungen kontaminierten Habitaten (z. B. Boden, Abwasserschläm, Frischwassersediment) isoliert. Es handelt sich um gerade bis leicht gekrümmte, meist bewegliche Stäbchen mit einer Länge von

2 - 7  $\mu\text{m}$  und einem Durchmesser von ca. 0,5  $\mu\text{m}$ . In ihrem vielseitigen Stoffwechsel können neben Pyruvat und Laktat, auch Formiat oder Wasserstoff als Elektronendonator genutzt werden. Das Spektrum der Elektronenakzeptoren umfasst unter anderem chlorierte Verbindungen wie PCE oder 3-Chlor-4-Hydroxyphenylacetat (ClOHPA), aber auch Schwefelverbindungen (z. B. Thiosulfat), Nitrat oder Metallkationen (Villemur et al. 2006). Das in dieser Arbeit untersuchte Bakterium, *Desulfitobacterium hafniense* Y51, besitzt die Fähigkeit neben PCE auch chlorierte Ethane wie z. B. Hexachlorethan umzusetzen (Suyama et al. 2001). Die reduktive Dechlorierung von Tetrachlorethen (PCE) erfolgt in diesem Mikroorganismus bis zu *cis*-1,2-Dichlorethen als Endprodukt (Futagami et al. 2008). Dieser Prozess wurde als Organohalid-Respiration (früher: Dehalorespiration) beschrieben (Suyama et al. 2001). Die Verwendung von Pyruvat als Elektronendonator während der Kultivierung ermöglicht jedoch keinen zweifelsfreien Nachweis der Energiegewinnung durch Elektronentransportphosphorylierung (ETP), da die Oxidation von Pyruvat die ATP-Synthese über Substratstufenphosphorylierung erlaubt.

Die 16S rDNA-Sequenzen verschiedener Desulfitobakterien weisen große Sequenzhomologien auf. Einzelne Spezies können zudem anhand ihrer morphologischen und metabolischen Besonderheiten unterschieden werden. So ist es möglich, *Desulfitobacterium hafniense* Y51 (Suyama et al. 2001) und den nahverwandten *D. hafniense* PCE-S (Miller et al. 1997) durch Merkmale wie Beweglichkeit bzw. Zellmorphologie zu unterscheiden. Eine gerichtete Bewegung konnte nur bei Zellen von *D. hafniense* Y51 beobachtet werden. Stamm PCE-S zeichnet sich durch eine Art Schleimhülle, die bei *D. hafniense* Y51 nicht vorhanden ist (Abb. 1-2).



**Abbildung 1-2:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Dünnschnitten von *D. hafniense* Y51 (A) und *D. hafniense* PCE-S (B). Die Kultivierung der Zellen erfolgt mit Pyruvat und PCE. Cm - Cytoplasmamembran, Cy - Cytoplasma, Ss - Schleimschicht.



## 1.4 Reduktive Tetrachlorethen-Dehalogenase

Die reduktiven Dehalogenasen sind die Schlüsselenzyme bei der reduktiven Dehalogenierung chlorierter oder bromierter organischer Verbindungen. Als Enzymsubstrate können unter anderem chlorierte Ethene (z. B. PCE, TCE) oder Chlorphenole (z. B. Tetrachlorphenol, ClOHPA) genutzt werden. Das Schlüsselenzym der reduktiven Dechlorierung von PCE ist die Tetrachlorethen reduktive Dehalogenase (PceA).

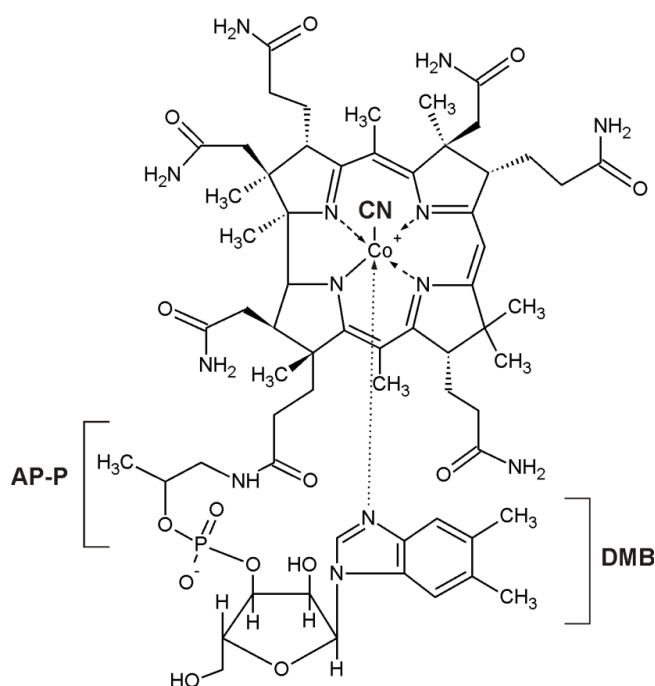
### Aufbau der PCE-Dehalogenase

Der Aufbau der PCE-Dehalogenasen (PceA) verschiedener dechlorierender Mikroorganismen ist im Allgemeinen sehr ähnlich. Bei PceA handelt es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von 48 - 65 kDa. Als Cofaktoren beinhaltet die PCE-Dehalogenase zwei Eisen-Schwefel-Zentren und einen Corrinoïd-Cofaktor (Holliger et al. 1999, Siebert et al. 2002). Am N-Terminus des PceA-Proteins befindet sich ein ungefähr 35 Aminosäuren langes Signalpeptid mit der konservierten Sequenz RRxFxK. Diese zeichnet PceA als Substrat des „twin arginine translocation“ (Tat) - Weges für den Transport des Proteins über die Cytoplasmamembran aus (Berks et al. 2000). Der Tat-Transportweg dient der Translokation gefalteter, meist Cofaktor-haltiger Proteine. Dazu zählen unter anderem Proteine mit Molybdän-haltigem Cofaktor wie z. B. die Trimethylamin-N-Oxid (TMAO)-Reduktase aus *Escherichia coli*. Für die TMAO-Reduktase konnte zudem gezeigt werden, dass der Einbau des Cofaktors eine notwendige Voraussetzung für die Translokation ist (Santini et al. 1998). Weitere Tat-Substrate stellen das Häm-haltige Protein YcdB aus *Escherichia coli* (Sturm et al. 2006) oder Proteine mit Eisen-Schwefel-Clustern wie die Nitratreduktase NapA aus *Escherichia coli* dar (Thomas et al. 1999). Für den Tat-abhängigen Transport der PCE-Dehalogenase ist neben der korrekten Faltung des Proteins vermutlich der Einbau des Corrinoïd-Cofaktors und der Eisen-Schwefel-Cluster notwendig. In *D. hafniense* Y51 besteht das Tat-System aus den Komponenten TatA und TatC (Nonaka et al. 2006). TatA dient der Ausbildung der Translokationspore und TatC der Erkennung des Tat-Substrates. Ähnliche Systeme lassen sich in vielen Bakterien wie *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* oder *Corynebacterium glutamicum* sowie Archaea wie *Archaeoglobus fulgidus* oder *Haloferax volcanii* nachweisen (Dilks et al. 2003; Jongbloed et al. 2004). Im Gegensatz dazu besteht das Tat-System in *Escherichia coli* aus den Komponenten TatA, TatB und TatC (Sargent et al. 1998, Weiner et al. 1998).

Vor der Abspaltung des Signalpeptids wird von der sogenannten Vorläuferform - präPceA - gesprochen. Im Falle von *D. hafniense* Y51 besitzt präPceA ein errechnetes Molekulargewicht von 61 kDa (Suyama et al. 2002). Während der Translokation von PceA über die Cytoplasmamembran wird das Signalpeptid abgespalten und die reife bzw. mature Form der PCE-Dehalogenase mit einer theoretischen Größe von 58 kDa entsteht (Suyama et al. 2002).

### Der Corrinoïd-Cofaktor

Der Corrinoïd-Cofaktor der PCE-Dehalogenase, ein Derivat des Vitamin B<sub>12</sub>, ist essentiell für die Funktion des Enzyms. Vitamin B<sub>12</sub> besteht aus einem Tetrapyrrolringsystem mit Kobalt als Zentralatom (Abb. 1-3).

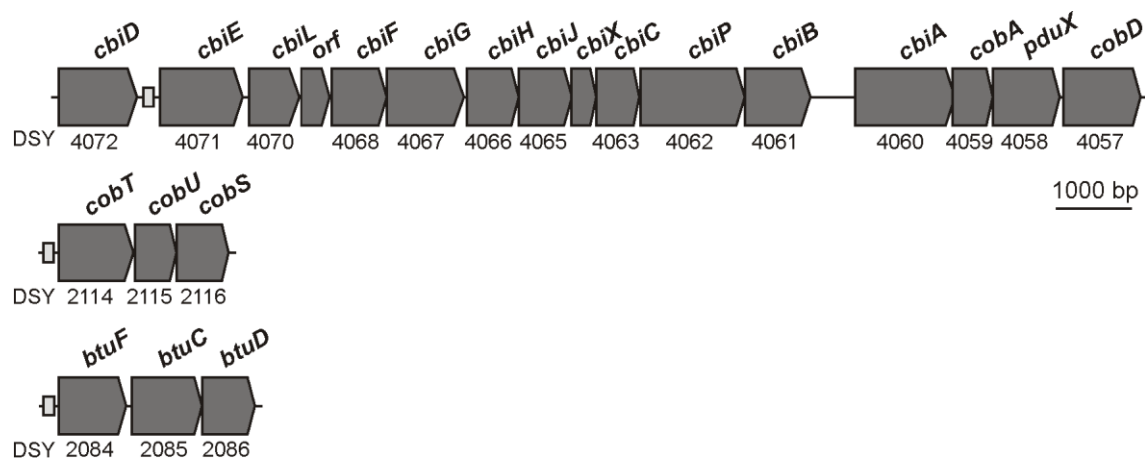


**Abbildung 1-3:** Struktur von Vitamin B<sub>12</sub> (Cyanocobalamin). DMB - 5,6 Dimethylbenzimidazol, AP-P - Amino-propanol-O-2-Phosphat. Die Struktur wurde mit ACD/ChemSketch Version 12.01 erstellt.

Neben den Bindungen des zentralen Kobaltatoms zu den Stickstoffatomen der Pyrrolringe bestehen weitere Bindungen zu zwei Axialliganden. Bei Vitamin B<sub>12</sub> entspricht der untere Ligand einem 5,6-Dimethylbenzimidazol (DMB)-Rest. Dieser Ligand ist über eine Brücke, 1-Aminopropanolphosphat-Rest, mit dem Corrinring verbunden. Zusammen werden Linker und der untere Ligand als Nukleotid-Schleife bezeichnet. Der untere Ligand kann bei verschiedenen Vitamin B<sub>12</sub>-Derivaten variieren (Cheong et al. 2001). So besitzt das auch häufig isolierte Pseudovitamin B<sub>12</sub> Adenin als unteren Liganden (Taga et al. 2008). Zudem können auch Phenol oder *p*-Cresol als untere Liganden fungieren können (Stupperich et al. 1989). Der obere Ligand kann ebenfalls variieren. So handelt es sich um eine Cyanogruppe

bei Vitamin B<sub>12</sub> (Cyanocobalamin), während in der Natur eine Adenosylgruppe oder eine Methylgruppe diesen Platz besetzt (Warren et al. 2002). Die Cyanogruppe ist ein artifizieller oberer Ligand, der während der Extraktion von Corrinoïden mit Kaliumcyanid aus Bakterien gebunden wird. Bei der Adenosyl- und Methylgruppe handelt es sich hingegen um natürliche vorkommenden Liganden.

Bis jetzt konnte der Corrinoïd-Cofaktor der PCE-Dehalogenase aus *D. hafniense* Y51 nicht strukturell aufgeklärt werden. Für den nah verwandten *D. hafniense* PCE-S wurde gezeigt, dass mehrere strukturell verschiedene Corrinoïde als Cofaktoren für PceA in Frage kommen (Siebert 2002). Der einzige Corrinoïd-Cofaktor, der bis heute identifiziert werden konnte, ist das Norpseudob<sub>12</sub> der PCE-Dehalogenase aus *S. multivorans* (Kräutler et al. 2003). Die Analyse des Genoms von *D. hafniense* Y51 zeigte, dass alle Gene für eine *de novo* Biosynthese des Corrinoïd-Cofaktors vorhanden sind (Abb. 1-4; Nonaka et al. 2006). Daneben existiert ein Gencluster *btuFCD*, welcher für einen Corrinoïd-spezifischen „ATP binding cassette“ (ABC)-Transporter kodiert. Die Aufnahme von Corrinoïden durch dieses Transportsystem konnte bereits in *Escherichia coli* gezeigt werden. Hier wird das Transportsystem durch die Gene *btuBFCD* kodiert (Cadieux et al. 2002, Borths et al. 2002, Borths et al. 2005).



**Abbildung 1-4:** Gene der Corrinoïd-Biosynthese in *D. hafniense* Y51. Angegeben ist die Identifikationsnummer der Gene mittels Locus\_tag (DSYxxxx). Die kleinen Boxen entsprechen mutmaßlichen Riboswitch-Elementen, die unter Verwendung der Software „Riboswitch Explorer“ identifiziert wurden (Abreu-Goodger et al. 2005).

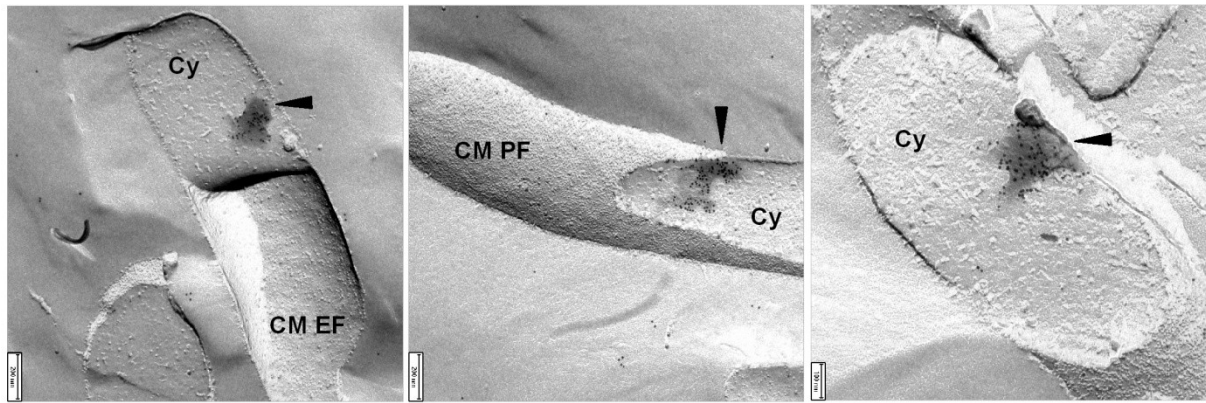
Innerhalb bzw. vor den Genclustern wurden unter Verwendung der Software „Riboswitch Explorer“ (Abreu-Goodger et al. 2005) mutmaßliche Riboswitch-Elemente identifiziert. Riboswitch-Elemente sind regulatorische RNA-Strukturen, die durch Bindung von Liganden (z. B. Aminosäuren, Purine, Cobalamine) eine Konformationsänderung erfahren und auf diese Weise sowohl die Transkription als auch die Translation regulieren

können (Rodionov et al. 2003, Vitreschak et al. 2004, Nudler et al. 2004, Breaker 2012). In der Regel führt die Ligandenbindung zu einer Repression der Genexpression. So konnte in *Escherichia coli* gezeigt werden, dass die Bindung des Corrinrings von Adenosylcobalamin oder auch Cyanocobalamin an die mRNA des BtuB-Proteins, welches am Vitamin B<sub>12</sub>-Transport beteiligt ist, zu einer Strukturveränderung der RNA führt. In Folge dessen kam es zur Inhibierung der Ribosomenbindung, gefolgt von der Repression der Translation und schließlich zu einer verminderten Produktion von BtuB (Nahvi et al. 2002, Gallo et al. 2008).

### Subzelluläre Lokalisation der PCE-Dehalogenase

Es besteht ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen dem Elektronenfluss vom Elektronendonator zum terminalen Elektronenakzeptor und der subzellulären Lokalisation der reduktiven Dehalogenase. In *S. multivorans*, *D. hafniense* Y51 und *D. hafniense* PCE-S konnte gezeigt werden, dass die subzelluläre Lokalisation der PCE-Dehalogenase durch die Anwesenheit des Enzymsubstrates PCE beeinflusst wird (John et al. 2006, John 2007, Reinhold 2008, Reinhold et al. 2012). In diesen Organismen wurde in Anwesenheit von PCE eine exoplasmatische, membran-assoziierte Lokalisation der PCE-Dehalogenase gezeigt. Ebenfalls für *D. mccartyi* 195 wurde eine exoplasmatische Lokalisation der PCE-Dehalogenase angenommen (Nijenhuis et al. 2005). Im Gegensatz dazu wurde für die PCE-Dehalogenase aus *D. restrictus* PER-K23 eine cytoplasmatische membran-assoziierte Lokalisation der PCE-Dehalogenase vermutet (Schumacher et al. 1996). Diese Unterschiede könnten auf unterschiedliche Elektronentransportketten in den Organismen hindeuten.

In *D. hafniense* Y51 wie auch in *S. multivorans* führte die Abwesenheit von PCE zu einer cytoplasmatischen Lokalisation der PCE-Dehalogenase. Während in *S. multivorans* PceA löslich vorliegt (John et al. 2006, John 2007), wurde in *D. hafniense* Y51 eine membran-nahe Aggregation von PceA beobachtet (Abb. 1-5; Reinhold 2008). Dieses Phänomen trat ebenfalls in dem nahverwandten *D. hafniense* PCE-S auf, konnte aber in keinem weiteren dechlorierenden Mikroorganismus beobachtet werden. Des Weiteren konnte aufgrund der Größenunterschiede von präPceA und reifem PceA-Protein in *D. hafniense* Y51 im Cytoplasma die präPceA-Form nachgewiesen werden, während die reife Form des Proteins fast ausschließlich im Exoplasma vorhanden war (Reinhold 2008, Furukawa et al. 2005).



**Abbildung 1-5:** Subzelluläre Lokalisation von PceA in *D. hafniense* Y51 in Abwesenheit von PCE. Die Lokalisation wurde per Elektronenmikroskopie nach Gefrierbruch der Zellen untersucht. Es erfolgte eine Immungoldmarkierung von PceA mit spezifischen Antikörpern. Die Abbildung wurde aus Reinhold (2008) entnommen. Cy - Cytoplasma, CM EF - exoplasmatische Seite der Cytoplasmamembran, CM PF - protoplasmatische Seite der Cytoplasmamembran.

### Genetische Organisation

Die Gene der reduktiven Dehalogenasen sind meist in einem Gencluster bestehend aus mindestens 2 Genen (*rdhA* und *rdhB*) organisiert (Neumann et al. 1998, Futagami et al. 2008). Das Gen *rdhA* kodiert für die reduktive Dehalogenase. Das Genprodukt von *rdhB* wurde als mutmaßlicher Membrananker für RdhA beschrieben (Neumann et al. 1998). Das Gen *rdhA* wird im Fall der PCE-Dehalogenase bzw. der Chlorphenol-Dehalogenase als *pceA* bzw. *cprA* bezeichnet. In *D. hafniense* Y51 ist *pceA* Bestandteil des Gencluster *pceABCT* (Abb. 1-6; Futagami et al. 2008). Das Gen *pceC* weist Sequenzhomologien zu Genen auf, die für transmembrane Transkriptionsregulatoren des NirI/NosR-Typs kodieren (Saunders et al. 1999, Wunsch et al. 2005). Diese sind an der Regulation der Nitrit- und N<sub>2</sub>O-Reduktion beteiligt. Das PceC-Protein beinhaltet eine mutmaßliche Flavinmononukelotid (FMN)-bindende, sowie zwei Eisen-Schwefel-Cluster bindende Domänen. Das Gen *pceT* kodiert für eine Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase. Für PceT wird eine Beteiligung an der Reifung der PCE-Dehalogenase als Faltungshelfer vermutet (Morita et al. 2009). Eine Interaktion von PceT mit der Tat-Signalsequenz von präPceA konnte bereits gezeigt werden (Maillard et al. 2011). Flankiert wird der Gencluster von 2 Insertionselementen (*ISDesp*), in denen Transposasen (*tnp*) der IS256-Familie kodiert sind (Abb. 1-6; Futagami et al. 2006, Furukawa et al. 2005). Für Transposasen dieser Familie wurde beschrieben, dass es während der Transposition zur Ausbildung von zirkulären Intermediaten kommt (Loessner et al. 2002). Sowohl vor als auch nach den Transposasen befinden sich wiederholende Sequenzbereiche (Inverted Repeats). Erfolgt durch homologe Rekombination der Inverted Repeats ein

The figure displays seven horizontal genomic maps of different bacterial strains, each with a corresponding label and GenBank accession number. The maps are color-coded: yellow for *tnp*, red for *pceA*, green for *pceB*, purple for *pceC*, blue for *pceT*, and grey for other genes. A scale bar at the bottom indicates 1000 bp.

- D. hafniense* Y51** (GenBank: AY706985.2): *tnp* (yellow), *pceA* (red), *pceB* (green), *pceC* (purple), *pceT* (blue), *tnp* (yellow).
- D. hafniense* PCE-S** (A. Reinhold, unveröffentlicht): *tnp* (yellow), *pceA* (red), *pceB* (green), *pceC* (purple), *pceT* (blue), *tnp* (yellow).
- D. hafniense* DCB-2** (Dhaf\_0696-0700): *rdhA* (red), *rdhB* (green), *rdhC* (purple), *rdhT* (blue), *cnp* (grey).
- D. hafniense* TCE-1** (GenBank: AJ439608.2): *tnp1* (yellow), *pceA* (red), *pceB* (green), *pceC* (purple), *pceT* (blue), *tnp* (yellow), *tnp* (yellow).
- Dehalobacter restrictus*** (GenBank: AJ439607.2): *tnp* (yellow), *pceA* (red), *pceB* (green), *pceC* (purple), *pceT* (blue), *tnp* (yellow).
- D. dehalogenans*** (GenBank: AF115542.2): *cprT* (grey), *cprK* (grey), *cprZ* (grey), *cprE* (grey), *cprB* (green), *cprA* (red), *cprC* (purple), *cprD* (blue), *mcp* (grey).
- Dehalococcoides mccartyi* 195** (GenBank: CP000027.1): *tceA* (red), *tceB* (green).
- Sulfurospirillum multivorans*** (GenBank: AF022812.1): *ribA* (grey), *ribB* (grey), *ribH* (grey), *orf1* (grey), *pceA* (red), *pceB* (green), *nifU* (grey).

1000 bp

---

11

## 1.5 Regulation der reduktiven Dechlorierung

Die Mechanismen zur Regulation der reduktiven Dechlorierung sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist bekannt, dass die Aktivität der reduktiven Dehalogenasen sowohl durch die Anwesenheit als auch durch die Abwesenheit von chlorierten oder nicht-chlorierten Verbindungen beeinflusst werden kann (Smidt et al. 2004). Inhibitorische Effekte auf die Enzymaktivität konnten für Substanzen wie Sulfit oder Thiosulfat gezeigt werden (deWeerd et al. 1990, Townsend et al. 1997). Positive Wirkungen auf die dechlorierende Aktivität wiesen hingegen Verbindungen wie 3-Chlorbenzoat, Phenol, 2-Chlorphenol oder auch 3-Chlor-4-Hydroxybenzoat auf (deWeerd et al. 1990, He et al. 2002). In *D. hafniense* DCB-2 konnte erstmals gezeigt werden, dass die Expression der *rdh*-Gene durch Zugabe von chlorierten Verbindungen wie 3-Chlor-4-Hydroxybenzoat oder 3,5-Dichlorphenol gesteigert werden kann (Kim et al. 2012). Die Gencluster der reduktiven Dehalogenasen beinhalten häufig Gene, deren Genprodukte als mutmaßliche Regulatorproteine beschrieben wurden. Bei Desulfitobakterien handelt es sich zum Einen um Regulatoren, die Ähnlichkeiten zu Fumarat/Nitrat-Regulatoren (FNR) und cAMP-Rezeptor-Proteinen (CRP) wie *cprK*, aufweisen, zum Anderen kommen auch Regulatoren des NirI/NosR-Typs (*cprC*, *pceC*) vor. In *D. dehalogenans* konnte für CprK gezeigt werden, dass es als Sensor für die Anwesenheit von Chloraromaten fungiert. Nach Bindung von 3-Chlor-4-Hydroxyphenylacetat (CLOHPA) bindet CprK an die DNA und steigert die Expression der Gene des *cprBACD*-Genclusters (Smidt et al. 2000, Pop et al. 2004, Levy et al. 2008).

Über die Regulation der Expression von *pceA* ist wenig bekannt. In *D. hafniense* KBC1 konnte die Co-Expression der Gene des *pceAB*-Genclusters durch PCE gesteigert werden (Tsukagoshi et al. 2006). In *S. multivorans* wurde gezeigt, dass die Abwesenheit von PCE eine Verringerung bzw. den kompletten Verlust des *pceAB*-Transkriptes zur Folge hat. So waren nach 35 Subkultivierungen in Abwesenheit von PCE weder das PceA-Protein noch eine dechlorierende Aktivität nachweisbar (John 2007, John et al. 2009, Rubick 2010). Das hier beobachtete Phänomen wurde als Langzeitregulation der Organohalid-Respiration bezeichnet.

In *D. hafniense* PCE-S führte die Abwesenheit von PCE zu einem Verlust von PceA und der dechlorierenden Aktivität nach 40 Subkulturen. In *D. hafniense* Y51 kam es hingegen entweder zu einer konstanten Bildung des PceA-Proteins unter Verlust der Enzymaktivität oder zu einem Verlust von PceA-Protein und Aktivität nach circa 30 Subkultivierungen (Reinhold 2008, Reinhold et al. 2012). In beiden Organismen konnte zeitgleich mit der Abnahme und dem Verlust der dechlorierenden Aktivität, ein starker Rückgang des

Corrinoidgehaltes der Zellen beobachtet werden (Reinhold 2008). Im Fall der konstanten Bildung von PceA in *D. hafniense* Y51 wurde vermutet, dass der Mangel an Corrinoid-Cofaktor den Aktivitätsverlust von PceA bewirkt (Reinhold 2008). Auch die Kombination der Wachstumssubstrate Fumarat und PCE oder TCE, als terminale Elektronenakzeptoren, führte zu einem Verlust des PceA-Proteins und der dechlorierenden Aktivität.

## 1.6 Zielstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein Modell über die Bildung und Reifung von PceA in *D. hafniense* Y51 entwickelt werden. In dieses Modell sollte der Einfluss terminaler Elektronenakzeptoren sowie externer Corrinoid-Quellen auf die Biosynthese von PceA einbezogen werden. Schwerpunkte lagen auf der Bildung und Stabilität der PceA-Aggregate sowie der Dynamik des Aggregationsprozesses in Abwesenheit von PCE. Zudem sollte die Zusammensetzung der PceA-Aggregate sowie deren strukturelle und biochemische Eigenschaften aufgeklärt werden. Ein weiterer Aspekt war die Untersuchung der Biosynthese des Corrinoid-Cofaktors der PCE-Dehalogenase und dessen Varianz in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von PCE und externen Corrinoid-Quellen. Die Aufklärung der molekularbiologischen Ursache des Verlustes des PceA-Proteins, die Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Proteine PceB und PceT sowie die Studien zur Interaktion von PceA und PceB sollten am Ende mit den bereits gewonnen Erkenntnissen in dem Modell zusammengefasst werden.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Mikroorganismen und Materialien

In der vorliegenden Arbeit wurden *Desulfitobacterium hafniense* Y51 (Suyama et al. 2001), und *Sulfurospirillum multivorans* (Scholz-Muramatsu et al. 1995; DSM 15119) verwendet. *D. hafniense* Y51 und die auf Grund der Transposition des *pce*-Genclusters nicht dechlorierende „Large Deletion“ (LD)-Variante des Stammes wurden von der japanischen Arbeitsgruppe um Dr. Taiki Futagami und Prof. Dr. Kensuke Furukawa (Universität Kyushu, Fakultät für Landwirtschaft, Abteilung Biowissenschaft und Biotechnologie, Fukuoka, Japan) zur Verfügung gestellt. In Tabelle 2-1 sind die für die Doktorarbeit verwendeten Kultivierungen zusammengefasst.

**Tabelle 2-1:** Übersicht über die verwendeten Langzeitkultivierungen (LZK).

LZK	Referenz	Merkmale
<b>1</b>	Reinhold 2008 Abb. 3-16 D	<b><i>D. hafniense</i> Y51</b>
		Substrate: Pyruvat, Fumarat
		kontinuierliche Bildung des PceA-Proteins
		Verlust der dechlorierenden Aktivität nach 35 Subkulturen
<b>2</b>	Reinhold 2008	<b><i>D. hafniense</i> Y51</b>
		Substrate: Pyruvat, PCE
		kontinuierliche Bildung des PceA-Proteins
		konstante dechlorierende Aktivität
<b>3</b>	Reinhold 2008	<b><i>D. hafniense</i> PCE-S</b>
		Substrate: Pyruvat, Fumarat
		Verlust des PceA-Proteins nach 35 Subkulturen
		Verlust der dechlorierenden Aktivität nach 35 Subkulturen

Chemikalien und Gase wurden falls nicht anders beschrieben in der höchstmöglichen Reinheitsstufe von folgenden Firmen bezogen: AppliChem GmbH (Darmstadt, D), Merck KGaA (Darmstadt, D), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D), Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg, D), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D), VWR International GmbH (Darmstadt, D). Alle verwendeten Gase (CO<sub>2</sub> - Reinheitsgrad 4.5; N<sub>2</sub> - Reinheitsgrad 5.0; Formiergas - N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> 95:5 v/v, H<sub>2</sub> - Reinheitsgrad 4.3) wurden von Linde AG (Leuna, D) bezogen. Falls nicht anderes angegeben wurden für die molekularbiologischen Untersuchungen Produkte der folgenden Firmen verwendet: Analytik Jena AG (Jena, D),

Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D), QIAGEN GmbH (Hilden, D) und Roche Diagnostics (Mannheim, D).

## 2.2 Kultivierung der Mikroorganismen

Die verwendeten Mikroorganismen wurden in einem Minimalmedium bestehend aus Basalmedium (Tab. 2-2), Hefeextrakt (0,2% w/v) und Resazurin (1 mg/l) kultiviert (Scholz-Muramatsu et al. 1995).

**Tabelle 2-2:** Zusammensetzung des Basalmediums.

Bestandteil	Konzentration
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,07 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g/l
NH <sub>4</sub> Cl	0,25 g/l
NaCl	1 g/l
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,4 g/l
KCl	0,5 g/l
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,15 g/l

Als Elektronendonator wurde Pyruvat (40 mM) verwendet. Die Stammhaltung der Organismen erfolgte mit Tetrachlorethen (PCE, 10 mM, gelöst in Hexadekan) als terminalen Elektronenakzeptor. Die Zugabe von PCE erfolgte unmittelbar vor dem Beimpfen der Kulturen. Fumarat (40 mM) diente als alternativer Elektronenakzeptor. Nach dem Anaerobisieren und Autoklavieren wurde das Medium mit NaHCO<sub>3</sub> (40 mM), Cystein-HCl (0,005% w/v), FeSO<sub>4</sub> (0,09 mM) und Supplementlösung (1% v/v; Tab. 2-3) komplettiert. Bei Kultivierung von *D. hafniense* Y51 in Abwesenheit von externen Vitamin B<sub>12</sub> wurde die Vitaminlösung 2 durch Wasser ersetzt.

Die Kultivierung erfolgte in Serumflaschen mit N<sub>2</sub>-Atmosphäre. Die Flaschen wurden mit Butyl-Gummistopfen bzw. Teflon-Septen verschlossen. Die Kulturen wurden stets mit einem Inokulum von 10% beimpft und bei 28° unter Schütteln (140 rpm) kultiviert. Das Kulturvolumen betrug je nach Verwendungszweck 50, 100 bzw. 1000 ml (Großzucht).

**Tabelle 2-3:** Zusammensetzung der Supplementlösung.

Volumen	Bestandteil	Konzentration
<i>3 ml</i>	<b><i>Vitaminlösung 1</i></b>	
	<i>p</i> - Aminobenzoessäure	0,4 g/l
	D (+) - Biotin	0,1 g/l
	Nicotinsäure	1 g/l
	Ca - D (+) - Pantothenat	0,5 g/l
	Pyridoxamin x 2 HCl	1,5 g/l
	Thiaminchlorid x HCl	1 g/l
<i>0,6 ml</i>	<b><i>Vitaminlösung 2</i></b>	
	Cyanocobalamin	0,25 g/l
<i>6 ml</i>	<b><i>Spurenelementlösung SL 10</i></b>	
	25% HCl	50 ml/l
	FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	5 g/l
	MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,5 g/l
	ZnCl <sub>2</sub>	0,35 g/l
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,03 g/l
	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,95 g/l
	CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,01 g/l
	NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,12 g/l
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,18 g/l
<i>0,6 ml</i>	<b><i>Selenitlösung</i></b>	
	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,13 g/l
<i>1,2 ml</i>	<b><i>Wolframatlösung</i></b>	
	Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,165 g/l
<i>30 ml</i>	1 M KPP pH 7,5	
<i>253 ml</i>	<b><i>bidestilliertes Wasser</i></b>	

Trübungsmessung

Zur Kontrolle des Wachstums wurde die optische Dichte bei 578 nm gemessen. Die Messung erfolgte photometrisch (Pharmacia Biotech Novaspec II, Uppsala, Schweden) mit Wasser als Blindwert. Zu den Kulturproben wurde zuvor eine Spatelspitze Natrium-Dithionit gegeben, um das verwendete Resazurin in den farblosen reduzierten Zustand zu überführen.

### Konservierung

Die kurzfristige Lagerung der Bakterienstämme erfolgte bei 4°C. Zur langfristigen Konservierung wurden anaerobe Glyzerinkonserven in mit Teflon-Septen verschlossenen Gläschen angelegt. Ein Aliquot der Kultur (5 ml) wurde mit 550 µl einer Lösung aus 87% (v/v) Glyzerin, 5% (w/v) Cystein-HCl und 3% (w/v) Na<sub>2</sub>S versetzt und die Suspension anschließend bei -80°C gelagert.

### Gewinnung von Einzelkolonien

Zur Gewinnung von Einzelkolonien wurde eine gewachsene Kultur in 0,9%iger NaCl-Lösung steril verdünnt und 0,5 ml der verdünnten Zellsuspension auf anaerobem Nährboden ausplattiert. Für den Nährboden wurden 30 ml Flüssigmedium (40 mM Pyruvat, 40 mM Fumarat; siehe oben) mit 1,2% gereinigtem Agar (Applichem, Darmstadt, D) verfestigt. Um den Einfluss von eingetragenen Sauerstoff zu reduzieren, wurde dem Medium die 3-fache Menge an Cystein-HCl (0,015% w/v) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 28°C. Einzelkolonien von *D. hafniense* Y51 zeichneten sich durch eine bräunliche Färbung aus. Diese wurden anschließend in Kulturröhrchen mit 5 ml Flüssigmedium (40 mM Pyruvat, 40 mM Fumarat) transferiert. Die Röhrchen wurden mit 2 Wattestopfen verschlossen. Der obere Stopfen wurde mit 400 µl Pyrogallol (10% w/v) und 600 µl Kaliumcarbonat (62,5% w/v) versetzt, was zur Anaerobisierung des gesamten Röhrchens führte. Nach Kultivierung bei 28°C wurde die Kultur in Serumflaschen mit 25 ml Flüssigmedium überführt.

## **2.3 Reinigung der PceA-Aggregate**

Für die Reinigung der PceA-Aggregate wurde *D. hafniense* Y51 in Abwesenheit von PCE kultiviert (LZK1, 15 Subkulturen, 10% Inokulum). Als Kontrolle dienten Zellen von *D. hafniense* Y51, die in Anwesenheit von PCE gewachsen sind (LZK2). Beide Zelltypen wurden im Folgenden der gleichen Reinigungsprozedur unterzogen. Die Zellen wurden in der späten exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{578\text{ nm}} \sim 0,6$ ) abzentrifugiert (10 min, 6.700 xg, 4°C).

### Subzelluläre Fraktionierung

Im ersten Schritt der Reinigung wurde eine subzelluläre Fraktionierung der Zellen durchgeführt. Dafür wurden die sedimentierten Zellen in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 resuspendiert und mittels French Press (1000 psi) aufgeschlossen. Zelltrümmer und große

Membranfragmente wurden durch Zentrifugation (20 min, 12.000 x g, 4°C) abgetrennt. Durch Ultrazentrifugation des Überstandes (45 min, 100.000 x g, 4°C) sedimentierten die Proteinaggregate zusammen mit den Membranen. Nach zweimaligem Waschen mit 50 mM Tris-HCl pH 7,5 wurde die erhaltene Fraktion elektronenmikroskopisch untersucht (siehe Abschnitt: Negativfärbung der isolierten PceA-Aggregate).

#### Membransolubilisierung

Die erhaltene Membranfraktion wurde in 1 ml Solubilisierungspuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,2 M NaCl; 1% Natriumdesoxycholat) resuspendiert. Nach Inkubation (30 min, 1.400 rpm, Raumtemperatur) und Zentrifugation (20 min, 16.000 xg, 10°C) wurde das sedimentierte Material in 1 ml Waschpuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,25% Natriumdesoxycholat) aufgenommen. Nach Inkubation (15 min, 1.400 rpm, Raumtemperatur) und Zentrifugation (20 min, 16.000 xg, 10°C) wurde der gesamte Waschschrift dreimal wiederholt. Anschließend wurden die sedimentierten Proteinaggregate in bidestillierten Wasser gelöst.

#### Dichtegradientenzentrifugation

Zur Trennung von Proteinaggregaten und Membranproteinen (integral oder membran-assoziiert) wurde eine diskontinuierliche Saccharosegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Zunächst wurden Saccharosekonzentrationen zwischen 0% und 100% w/v (in 10%-Schritten), im weiteren Verlauf zwischen 70% und 86% w/v (in 2%-Schritten) verwendet. Der Saccharosegradient wurde in Zentrifugationsröhrchen durch Übersichten mit der jeweils geringer konzentrierten Saccharoselösung (jeweils 2 ml) erzeugt. Im Anschluss wurde die wässrige Proteinaggregat-Lösung zugegeben. Nach Ultrazentrifugation (3 h, 100.000 x g, 4°C; L8-70M Ultrazentrifuge, Rotor: 60Ti, Beckman Coulter, USA) wurden die einzelnen Schichten des Saccharosegradienten vorsichtig entnommen.

#### Proteinfällung

Um die Proteine in den einzelnen Schichten des Saccharosegradienten anzureichern, wurde eine Proteinfällung nach der Methode von Wessel et al. (1984) durchgeführt. Es wurde zu einer Volumeneinheit der Probe 4 Volumeneinheiten 100% Methanol gegeben. Nach Zugabe von einer Volumeneinheit Chloroform und 3 Volumeneinheiten bidestilliertem Wasser wurde der Ansatz gemischt und 5 min bei 9.500 xg zentrifugiert. Das sedimentierte

Material wurde mit 3 Volumeneinheiten 100% Methanol gemischt und für 5 min bei 16.000 xg zentrifugiert. Die sedimentierten Proteine wurden anschließend in 20 µl 50 mM Tris-HCl pH 7,5 resuspendiert. Im Anschluss an die Proteinfällung wurden die erhaltenen Fraktionen per SDS-PAGE (12% Polyacrylamidgel; 2 µl Fraktion pro Lane) aufgetrennt und eine Silberfärbung der Gele durchgeführt. Der Bereich mit sichtbaren Proteinbanden (der 86% Saccharose-Fraktion) wurde in Blöcke unterteilt und ausgeschnitten. Bei den Kontrollzellen wurde der gleiche Bereich der 86% Saccharose-Fraktion ausgeschnitten. Für die immunologische Analyse der Fraktionen zum Nachweis von PceA und PceT wurden 5 µl der Fraktion pro Spur aufgetragen.

#### Negativfärbung der isolierten PceA-Aggregate

Zur elektronenmikroskopischen Kontrolle der angereicherten PceA-Aggregate wurde die Membranfraktion auf ein Kohlenstoff-beschichtetes 400-Maschen EM-Netzchen aus Kupfer übertragen (Inkubation für 10 min). Nachdem das Netzchen mit destilliertem Wasser gewaschen wurde, erfolgte eine Negativfärbung für 1 min mit 2% Uranylacetat. Für die Analyse der gereinigten PceA-Aggregate wurde zunächst eine Proteinfällung (siehe oben) durchgeführt, um die Saccharosekonzentration der Probe zu verringern. Anschließend wurde die Probe wie die Membranfraktion behandelt. Die Analyse und Bilddokumentation erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop (EM 902A, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D) mit einer 1k FastScann CCD-Kamera (TVIPS-GmbH, München, D).

#### LC-MS/MS - Analyse

Die Analyse der Zusammensetzung der gereinigten Proteinaggregate erfolgte am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ) Leipzig in der Abteilung für Proteomik unter Leitung von PD Dr. Martin von Bergen. Die Analysen wurden von Dr. Jana Seifert durchgeführt. Zunächst wurde unter Verwendung von Kaliumferricyanid und Natriumthiosulfat das Silber aus den Gelblöcken entfernt (Gharahdaghi et al. 1999). Anschließend wurden die Proben mit Trypsin proteolytisch verdaut (Jehmlich et al. 2008) und die erhaltenen Peptide mit 0,1% Ameisensäure rekonstituiert. Danach wurden die Proben über einen Autosampler auf eine Trapping-Säule (nanoAcquity UPLC Säule, C18, 180 µm x 2 cm, 5 µm, Waters GmbH, Eschborn, D) aufgetragen und aufkonzentriert (Laufmittel: 0,1% Ameisensäure; Flussrate: 15 µl/min). Nach 4 Minuten wurden die Peptide auf die Trennsäule (nanoAcquity UPLC Säule, C18, 75 µm x 100 mm, 1.7 µm, Waters GmbH, Eschborn, D) eluiert. Die Chromatographie wurde mit 0,1% Ameisensäure (Laufmittel A) und 100%

Acetonitril (Laufmittel B) durchgeführt. Die Peptide wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten eluiert wobei ein Gradient von 8 bis 40% Laufmittel B unter Verwendung eines nano HPLC-Systems (nanoAcquity, Waters GmbH, Eschborn, D) erzeugt wurde. Die HPLC war an ein LTQ-Orbitrap Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) gekoppelt. Peptidionen mit einer Masse-Ladungs-Zahl ( $m/z$ ) zwischen 400 und 2000 wurden kontinuierlich gescannt. Ionen mit einer Intensität über 3000 wurden mittels MS/MS CID (collision-induced dissociation) analysiert (dynamischer Vorläuferausschluss: 3 min). Die erhaltenen Rohdaten wurden für eine Datenbanksuche per Thermo Proteome Discoverer Software (v1.0 build 43) mittels des Tandem-Ionen-Suchalgorithmus des Mascot Servers (v2.2.1) verwendet. Die Datenbankvergleiche erfolgten unter Verwendung des Genoms von *D. hafniense* Y51 (NC\_007907.1) in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, September 2010). Die Massentoleranz für die Vorläuferionen betrug 10 ppm, für die MS<sup>2</sup>-Fragmente 0,8 Da. Zudem wurden maximal 2 übergangene Schnittstellen der Protease Trypsin sowie variable Modifikationen (z.B. Oxidation des Methionins, Carbamidomethylierung des Cysteins) zugelassen. Peptide galten mit einem *score*-Wert > 40 und einem *expect value*-Wert < 0,05 als identifiziert. Ein Protein galt als sicher bestätigt, wenn mindestens zwei Peptide identifiziert wurden.

## 2.4 Extraktion von Corrinoïden

Die Kultivierung von *D. hafniense* Y51 erfolgte mit den in Tabelle 2-4 angegebenen Substratkombinationen. Die Kultivierung wurde im 6 l-Maßstab (10% Inokulum) durchgeführt. Die Zellen wurden bis zu einer optischen Dichte (578 nm) von 0,6 bis 0,7 kultiviert und anschließend zentrifugiert (10 min, 6.700 xg, 10°C). Die sedimentierten Zellen wurden bei -20°C gelagert.

**Tabelle 2-4:** Substratkombinationen für die Kultivierung von *D. hafniense* Y51 zur Extraktion von Corrinoïden.

Organismus	Pyruvat (40 mM)	Fumarat (40 mM)	PCE (10 mM)	Vitamin B <sub>12</sub> (30 nM)
<i>D. hafniense</i> Y51	+	+		+
	+	+		
	+		+	+
	+		+	

Für die Corrinoideextraktion wurden ca. 5 g Feuchtzellen in 30 ml anaeroben Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5) resuspendiert und DNase I (1 mg) zugegeben. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels French Press (French<sup>®</sup> Pressure Cell Press, SIM-AMINCO, Spectronic Instruments, New York, USA) bei 1000 psi. Von dem gewonnenen Rohextrakt wurde ein Aliquot für die Bestimmung der PceA-Aktivität und zum immunologischen Nachweis von PceA entnommen. Das Protokoll zur Extraktion der Corrinoide basierte auf der Methode von Stupperich et al. (1986). Das Volumen des Rohextraktes wurde bestimmt und der pH-Wert mit Essigsäure auf 5,0 eingestellt. Anschließend wurde Kaliumcyanid mit einer Endkonzentration von 0,1 M zugegeben und die Suspension 15 min gekocht. Nach Zentrifugation (20 min, 17.000 xg) wurde der Überstand in eine Schottflasche überführt. Das Pellet wurde in 15 ml bidestilliertem Wasser resuspendiert und die Extraktion wiederholt. Nach Vereinigung beider Überstände wurden 0,25 g Amberlite<sup>®</sup> XAD4-Material (Sigma-Aldrich, München, D) pro ml Überstand zugegeben. Zuvor wurde das Material mit 100% Methanol aufgeschwemmt und mit 500 ml 0,1% Essigsäure äquilibriert. Nach Inkubation über Nacht (Raumtemperatur, 50 rpm) wurde das XAD-Material mit den gebundenen Corrinoiden in eine Leersäule gegeben und mit dem 10-fachen Säulenvolumen an bidestilliertem Wasser gewaschen. Die Elution der gebundenen Corrinoide erfolgte in 3 Schritten. Im ersten Schritt wurde das Säulenmaterial mit 30 ml 100% Methanol, in den darauffolgenden Schritten mit jeweils 20 ml 100% Methanol inkubiert (1 h, Raumtemperatur). Nach der Elution wurden alle Fraktionen vereinigt und im Savant Speed Vac Concentrator 100H (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) eingengt. Die getrockneten Corrinoide wurden anschließend in 1 ml bidestilliertem Wasser resuspendiert. In einem zweiten Reinigungsschritt wurden die resuspendierten Corrinoide auf neutrales Aluminiumoxid (3 g), gefüllt in eine Leersäule, aufgetragen. Nachdem die Säule benetzt war, erfolgte ein Elutionsschritt mit 20 ml bidestilliertem Wasser. Die erhaltenen Fraktionen wurden eingengt und in 100 µl bidestilliertem Wasser resuspendiert.

Die Analyse der isolierten Corrinoide erfolgte per HPLC (Merck Hitachi, Darmstadt, D). Als stationäre Phase wurde eine Chromolith Performance RP-18e-Säule (100-4,6 mm: Merck KGaA, Darmstadt, D) verwendet. Als mobile Phase diente eine Lösung aus 18% Methanol und 0,2% Essigsäure mit einer Flussrate von 1 ml/min. Als Standardlösungen wurden jeweils 100 µM Cyanocobalamin (Vitamin B<sub>12</sub>), Hydroxocobalamin (Vitamin B<sub>12a</sub>), Adenosylcobalamin (Coenzym B<sub>12</sub>), Nor-Pseudovitamin B<sub>12</sub> und Pseudovitamin B<sub>12</sub> verwendet.



## 2.5 Analytische Methoden

### Proteingehalt

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Ganze Zellen wurden zuvor mit 0,2 N NaOH (50 µl pro 200 µl verdünnte Zellsuspension bzw. Standard) versetzt und durch Hitzebehandlung (15 min 95°C) aufgeschlossen. Für die Proteinbestimmung wurden 50 µl der Probe mit 200 µl Nachweisreagenz (Roti-Nanoquant, Roth, Karlsruhe, D) versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion bei 450 nm und 590 nm wurde am VERSAmax™ Microplate Reader (Molecular Devices, Ismaning/München, D) gemessen und der Quotient  $E_{590}/E_{490}$  bestimmt. Als Standard diente Rinderserumalbumin (RSA; 0 – 100 µg/ml). Für Proben und Standards wurde jeweils eine dreifache Bestimmung durchgeführt. Als Blindwert diente bidestilliertes Wasser.

### Chlorierte Ethene

Die Konzentration der chlorierten Ethene in den Kulturen wurde mittels Gaschromatographie (Chrompack CP 9000, Frankfurt, D) bestimmt (Neumann et al. 1994). Als stationäre Phase diente eine Ucon LB/WAW Säule (10%; 2 m x 2 mm; Werner Günther Analysentechnik, Moers, D) mit N<sub>2</sub> als Trägergas. Von der Kultur wurde 1 ml Probe entnommen. Diese wurde gasdicht abgefüllt und mit 20 µl 10 mM Nonan als internen Standard versetzt. Nach dem Erhitzen der Probe (6 min bei 95°C) wurden 250 µl der Gasphase injiziert. Mit den gewählten Parametern (Fluss: 25-30 ml min<sup>-1</sup>, 300 kPa; Säule: 80°C, Detektor: 150°C, Injektor: 250°C) ergaben sich folgende Retentionszeiten: *cis*-1,2-DCE 1,0 min, TCE 1,3 min, PCE 2,0 min, Nonan 2,3 min. Die Partialdrücke für H<sub>2</sub> und Luft betrugen 150 kPa bzw. 100 kPa.

### Aktivität der PCE-Dehalogenase

Die Messung der Aktivität der PCE-Dehalogenase basierte auf der Methode beschrieben durch Neumann et al. (1996) und Miller et al. (1997). Zentrifugierte Zellen wurden in 1 ml anaeroben 50 mM Tris-HCl pH 7,5 resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels French Press (French® Pressure Cell Press, SIM-AMINCO, Spectronic Instruments, New York) bei 1000 psi bzw. mittels Glasperlen (0,25 – 0,5 mm Durchmesser, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) in einer Schwingmühle (5 min 25 Hz; Retsch Mixer Mill

MM 400, Haan, D). Das Verhältnis von Glasperlen zu Zellsuspension betrug 1:1. Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch Zentrifugation (1 min, 5.250 xg) abgetrennt. Die Messung erfolgte in anaeroben Quarzküvetten bei einer Wellenlänge von 578 nm. Der Messansatz setzte sich aus 1 ml Tris-HCl-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5 mM Methylviologen) und 2 - 10 µl einer 1%igen Ti(III)citrat-Lösung zusammen. Durch Reduktion des Methylviologens wurde eine Absorption von 2 – 2,5 eingestellt. Nach Zugabe des Rohextraktes und 0,7 mM PCE wurde die Abnahme der Extinktion durch Oxidation des Methylviologens gemessen.

#### Bestimmung der abiotischen Dechlorierungsaktivität

Zur Bestimmung des Corrinoidgehaltes der Zellen von *D. hafniense* Y51 wurde die abiotische Dechlorierungsaktivität der Rohextrakte gemessen. Dafür wurden Zellen des Wildtyps von *D. hafniense* Y51 in Anwesenheit von PCE bzw. für 15 oder 60 Subkulturen in Abwesenheit von PCE kultiviert. Als Kontrolle diente die LD-Variante von *D. hafniense* Y51, welche sowohl in Anwesenheit von PCE (Pyruvat / PCE) als auch in Abwesenheit von PCE (Pyruvat / Fumarat) kultiviert wurde. Die Zellen wurden bis zu einer  $OD_{578\text{ nm}} \sim 0,4 - 0,5$  kultiviert und anschließend zentrifugiert (10 min, 6.000 xg, 10°C) und unter Verwendung von Glasperlen (0,25 - 0,5 mm Durchmesser, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) in einer Schwingmühle für 5 min bei 25 Hz (Mixer Mill MM400, Retsch, Haan, D) aufgeschlossen. Der Test erfolgte analog zur Messung der Aktivität der PCE-Dehalogenase. Statt PCE diente Trichloressigsäure (TCA) als terminaler Elektronenakzeptor. Im Messansatz befanden sich 700 µl Tris-HCl-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5 mM Methylviologen). Zur Reduktion des Methylviologens wurden 15 µl 1% Ti(III)citrat zugegeben (Absorption  $\sim 2,6$ ). Nach Zugabe des Rohextraktes wurde die Reaktion mit 100 µl 7 mM TCA gestartet. Es wurde die Abnahme der Absorption bei 578 nm gemessen. Das Prinzip des Tests beruht auf der Reduktion der  $Co^{III}$ -Form des Corrinoids zur  $Co^I$ -Form durch Methylviologen (Mv). Die Oxidation zurück zur  $Co^{III}$ -Form erfolgte durch Dechlorierung von TCA zu Dichloracetat (DCA). Die gemessene Aktivität konnte folglich als freigesetzte Chloridmenge in Bezug auf die eingesetzte Proteinmenge angegeben werden und spiegelt die Menge der in den Rohextrakten vorhandenen Corrinoiden wieder.

## 2.6 Proteinbiochemische Methoden

### SDS – Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels SDS-PAGE. Für die Gelelektrophorese wurde das „Minigel-Twin“-System von Biometra (Göttingen, D) verwendet. Die Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele ist in Tabelle 2-5 aufgeführt. Das Puffersystem setzte sich aus 5 mM Tris, 38,4 mM Glycin und 0,7 mM SDS zusammen.

**Tabelle 2-5:** Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele (nach Laemmli, 1970).

Komponente	Trenngel			Sammelgel
	9%	12%	13,5%	5%
30% Acrylamid / 8% Bisacrylamid	2,25 ml	3,00 ml	3,35 ml	350 µl
Bidestilliertes Wasser	3,10 ml	2,25 ml	2,0 ml	1275 µl
Trenngelpuffer <sup>a</sup>	2,05 ml	2,05 ml	2,05 ml	-
Sammelgelpuffer <sup>b</sup>	-	-	-	215 µl
10% APS	75 µl	75 µl	75 µl	19 µl
TEMED	3 µl	3 µl	3 µl	1,8 µl
<sup>a</sup> 1,5 M Tris-HCl pH 8,0; 0,4% SDS		<sup>b</sup> 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 0,4% SDS		

In Vorbereitung für die SDS-PAGE wurden die Proben mit einer Volumeneinheit Ladepuffer (125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% Glyzerin, 10%  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,01% Bromphenolblau) versetzt und denaturiert (5 min, 95°C). Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 13 mA im Sammelgel bzw. 22 mA im Trenngel. Als Größenstandard wurde der Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas, St. Leon-Rot, D) verwendet. Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamid-Gel zur Fixierung der Proteine für 15 min in 25% Isopropanol und 10% Essigsäure inkubiert. Im Anschluss an die irreversible Färbung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blau (30 min; 240 mg/l Coomassie, 10% Essigsäure) erfolgte die Entfärbung der Gele mit 10% Essigsäure.

### Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung der Polyacrylamidgele erfolgte nach der Methode von Schagger (2006). Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel für 20 Minuten in Fixierlösung (50% Methanol, 10% Essigsäure, 100 mM Ammoniumacetat) inkubiert. Anschließend wurde

das Gel mit bidestilliertem Wasser gewaschen (2 x 10 min) und für 20 Minuten in Sensitivierlösung (0,005% Natriumthiosulfat) gelegt. Zur Färbung der Proteine wurde eine 0,1%ige Silbernitratlösung hergestellt und das Gel direkt nach der Sensitivierung mit dieser Lösung inkubiert. Nachdem einem Waschschrift mit bidestilliertem Wasser wurde für 1 - 2 Minuten die Entwicklerlösung (0,036% Formaldehyd, 2% Natriumcarbonat) zugegeben. Die Reaktion wurde mit 50 mM EDTA pH 8,0 gestoppt.

### Western Blot

Zum Nachweis der PCE-Dehalogenase (PceA), des mutmaßlichen Membranankers PceB und des mutmaßlichen Chaperons PceT in den Rohextrakten bzw. subzellulären Fraktionen wurde im Anschluss an die SDS-Page (ohne Färbung) eine immunologische Analyse mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Zunächst wurden sowohl das Polyacrylamid-Gel als auch die PVDF-Membran (Roche, Mannheim, D) für 10 min in Blotpuffer (3 g/l Tris; 14,4 g/l Glycin, 20% v/v Methanol) äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde zuvor mit 100% v/v Methanol benetzt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte unter Verwendung der Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Biorad, München, D) für 1 h bei 15 V. Die Membran wurde anschließend mit Magermilchpulver (1 h; 3% in PBST-Puffer) inkubiert und mit PBST-Puffer (140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05% (v/v) Tween 20) 3 x 10 min gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 18°C. Die Antikörper wurden in folgenden Verdünnungsstufen (in PBST) verwendet: antiPceA - 1:5.000, antiPceB - 1:100.000, antiPceT - 1:100.000.

Nach Entfernung des primären Antikörpers (3 x 10 min; PBST-Puffer) wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur mit sekundärem Antikörper (Goat Anti-Rabbit IgG-AP Conjugate, Bio-Rad, München, D, 1:20.000) inkubiert. Vor Detektion gebundener Antikörper wurde freier Antikörper mit PBST-Puffer abgespült (3 x 10 min) und die Membran 2 min mit Tris-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>) äquilibriert. Für die Färbereaktion wurde die Membran für 5 - 10 min mit Tris-Puffer, dem NBT (p-Nitrotetrazoliumblausäurechlorid, 0,33 mg/ml in 70% (v/v) Dimethylformamid) und X-Phosphat (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-*p*-Toluidinsalz, 0,17 mg/ml in 100% (v/v) Dimethylformamid) zugesetzt wurde, inkubiert. Die Färbereaktion wurde mit 1 mM EDTA in 10 mM Tris-HCl pH 7,4 gestoppt.

Reinigung der Antikörper zum Nachweis der PCE-Dehalogenase

Zum immunologischen Nachweis der PCE-Dehalogenase wurde der Antikörper aus dem Antiserum eines gegen PceA immunisierten Kaninchens gewonnen. Für die Immunisierung des Kaninchens wurde die PCE-Dehalogenase aus *D. hafniense* Stamm PCE-S verwendet (Hinz 2007). Das erhaltene Antiserum wies im Western Blot viele unspezifische Reaktionen auf, was eine Reinigung der Antikörper erforderlich machte. Im ersten Schritt der Reinigung wurde die PCE-Dehalogenase in *Escherichia coli* BL21 (DE3) pRIL\_ptorA'PCE-S\_ST heterolog produziert. Der Stamm stand am Institut als Glyzerinkonserven zur Verfügung. Bei dem Plasmid ptorA'PCES\_ST handelte es sich ursprünglich um den Vektor pet11a (Stratagene, Amsterdam, Niederlande), in welchen ein modifiziertes *pceA*-Konstrukt kloniert wurde. Dieses Konstrukt kodierte für ein PceA-Protein, das am N-Terminus des Proteins mit dem TorA-Leaderpeptid (torA') und am C-Terminus mit einem Strep-Tag (ST) fusioniert wurde. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 5 ml LB-Medium (5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Pepton, 10 g/l NaCl). Als Selektionsmarker dienten Ampicillin (0,1 mg/ml) und Chloramphenicol (0,05 mg/ml). Der Vorkultur bzw. der Hauptkultur wurden zudem 1% bzw. 0,1% Glucose zugegeben und anschließend bei 28°C bzw. 37°C kultiviert. Bei einer optischen Dichte (578 nm) der Hauptkultur von 0,6 - 1,0 wurde die Expression der Gene durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Nach der Kultivierung (2 h; 37°C; 140 rpm) wurden die Zellen sedimentiert (2 min; 13.000 rpm; Eppendorf Centrifuge 5417, Hamburg, D) und bei -20°C gelagert. Die Produktion der PCE-Dehalogenase wurde mittels SDS-PAGE überprüft.

In *E. coli* wird die rekombinante PCE-Dehalogenase als inaktive Form gebildet und in Einschlusskörperchen gespeichert. Diese wurden in einem weiteren Schritt isoliert und gereinigt. Dazu wurden die Zellen in 600 µl 50 mM Tris-HCl pH 7,5 resuspendiert und für den Zellaufschluss mit 1 mg/ml Lysozym und DNase I (1 mg) versetzt. Nach Inkubation (3 h; 37°C) wurde die Suspension zentrifugiert (20 min; 16.000 xg) und das Sediment in Puffer 1 (2 ml; 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,2 M NaCl; 1% Natriumdesoxycholat) resuspendiert. Im Anschluss an einen Inkubationsschritt bei Raumtemperatur (15-30 min; 1.400 rpm) wurde das nach Zentrifugation (20 min; 16.000 xg) erhaltene Sediment in Puffer 2 (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,25% Natriumdesoxycholat) aufgenommen. Nach erneuter Inkubation (15 min, 1.400 rpm, Raumtemperatur) und Zentrifugation (20 min, 16.000 xg) wurde das Sediment abermals in Puffer 2 gelöst. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt bevor die gereinigten Einschlusskörperchen in 200 µl 50 mM Tris-HCl pH 7,5 versetzt mit 8 M Harnstoff

resuspendiert wurden. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Einschlusskörperchen bei 4°C gelagert.

Im letzten Schritt der Reinigung wurden die Einschlusskörperchen per SDS-PAGE (8% Polyacrylamid-Gel) aufgetrennt und die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde anschließend mit PonceauS-Lösung gefärbt (0,2% in 3% Trichloressigsäure), mit bidestilliertem Wasser gewaschen und die der PCE-Dehalogenase entsprechende Proteinbande ausgeschnitten. Nach Inkubation der Membranstreifen für 1 h in Magermilchpulver (3% in PBST-Puffer; Applichem, Darmstadt, D) und dreimaligen Waschen mit PBST-Puffer (je 10 min) wurden diese für 1 h in 1:20 verdünntes Antiserum gegeben (bei Raumtemperatur). Nachdem die Streifen wiederum mit PBST-Puffer (3 x 10 min) gewaschen wurden, erfolgte die Elution der gebundenen Antikörper mit 0,1 M Glycin pH 2,5 (2 x 1 ml). Zur Neutralisation (pH ~ 7,2) der erhaltenen Antikörperfraktion wurde 0,1 Volumeneinheiten einer 1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung zugegeben. Eine weitere Inkubation der Membranstreifen mit Antiserum war nach einem Waschschrift mit PBST-Puffer (10 min) und Inkubation mit Magermilchpulver (30 min) möglich. Insgesamt wurden 8 - 10 solcher Zyklen durchgeführt, die Antikörperfraktionen vereint und mittels PallFiltron 50K-Filtereinheiten (Pall German Laboratory, Dreieich, D) auf ein Volumen von ca. 100 µl eingengt. Zur Erhöhung der Stabilität der Antikörper wurden diese mit 1 mM Proteaseinhibitor PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) und 0,1% Rinderserumalbumin (RSA) versetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Die Qualität der Antikörper wurde per Western Blot-Analyse überprüft.

#### Antikörper zum Nachweis von PceB und PceT

Die polyklonalen Antikörper zum Nachweis von PceB und PceT wurden freundlicherweise von Dr. Taiki Futagami und Prof. Kensuke Furukawa (Kyushu Universität, Fukuoka, Japan) im gefriergetrockneten Zustand zur Verfügung gestellt. Für die Antikörperproduktion wurden jeweils Kaninchen verwendet. Die Antikörper wurden in PBS-Puffer aufgenommen und die Qualität mittels Western Blot-Analysen überprüft.

#### Far Western Blot

Zur Analyse der Interaktion von PceA und PceB in *D. hafniense* Y51 wurden synthetische Peptide des PceB Proteins erzeugt (Tabelle 2-6). Weiterhin wurden Peptide des periplasmatischen Loops und des cytoplasmatischen C-Terminus des PceB-Proteins aus *S. multivorans* synthetisiert. Die Synthese dieser Peptide erfolgte durch Dr. Diana Imhof am Institut für Biochemie (CMB, Friedrich-Schiller-Universität Jena).

**Tabelle 2-6:** Synthetischen Peptide des PceB Proteins aus *D. hafniense* Y51 und *S. multivorans*.

Peptid	Organismus	Position in PceB	Sequenz
P1 <sub>cyto</sub>	<i>D. hafniense</i> Y51	cytoplasmatisch <sup>N</sup>	<sup>26</sup> YLKGKGKDTI <sub>35</sub>
P2 <sub>exo</sub>	<i>D. hafniense</i> Y51	exoplasmatischer Loop	<sup>55</sup> GYSSFSEREYQAI <sub>67</sub>
P2 <sub>S58A</sub>	<i>D. hafniense</i> Y51	exoplasmatischer Loop*	<sup>55</sup> GYSAFSEREYQAI <sub>67</sub>
P2 <sub>E61A</sub>	<i>D. hafniense</i> Y51	exoplasmatischer Loop*	<sup>55</sup> GYSSFSAREYQAI <sub>67</sub>
P2 <sub>E63A</sub>	<i>D. hafniense</i> Y51	exoplasmatischer Loop*	<sup>55</sup> GYSSFSERAYQAI <sub>67</sub>
P2 <sub>Q65A</sub>	<i>D. hafniense</i> Y51	exoplasmatischer Loop*	<sup>55</sup> GYSSFSEREYAAI <sub>67</sub>
P3 <sub>cyto</sub>	<i>D. hafniense</i> Y51	cytoplasmatisch <sup>C</sup>	<sup>87</sup> RLANHPAKKIRESSDISA <sub>105</sub>
P4 <sub>exo</sub>	<i>S. multivorans</i>	periplasmatischer Loop	<sup>31</sup> GSYGEDEPQA <sub>40</sub>
P5 <sub>cyto</sub>	<i>S. multivorans</i>	cytoplasmatisch <sup>C</sup>	<sup>63</sup> FKPTYILWEK <sub>72</sub>

\* modifizierter exoplasmatischer Loop

<sup>N</sup> N-Terminus<sup>C</sup> C-Terminus

Die lyophilisierten Peptide wurden in Blotpuffer (3 g/l Tris; 14,4 g/l Glycin, 20% v/v Methanol) resuspendiert und auf eine Nitrocellulose-Membran (PALL GmbH, Dreieich, D) aufgetropft. Die getrocknete Membran wurde für 15 Minuten bei 95°C gebacken und anschließend in PBST-Puffer (140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05% (v/v) Tween 20) äquilibriert. Um die Bindung der Peptide zu überprüfen erfolgte eine Färbung der Membran mit 3% PonceauS (in Trichloressigsäure). Nach Inkubation für 1 h in 3% (w/v) Magermilchpulver (in PBST-Puffer) wurde die Membran mit PBST-Puffer gewaschen (3 x 10 min). Die Inkubation mit Rohextrakt von *D. hafniense* Y51 erfolgte für 4 Stunden bei 18°C. Für den Rohextrakt wurde *D. hafniense* Y51 in Anwesenheit von PCE kultiviert und die Zellen mittels French Press (French<sup>®</sup> Pressure Cell Press, SIM-AMINCO, Spectronic Instruments, New York, USA) bei 1000 psi aufgeschlossen. Der Proteingehalt des Rohextraktes wurde bestimmt und auf 2 mg/ml eingestellt. Nach 3 weiteren Waschschritten mit PBST-Puffer (je 10 min) wurde die Membran über Nacht mit PceA-spezifischen Antikörper (Verdünnung: 1:2500) inkubiert. Vor Zugabe des sekundären Antikörpers (Goat Anti-Rabbit IgG-AP Conjugate, Bio-Rad München, Verdünnung: 1:20.000; Biorad, München, D) wurde die Membran abermals mit PBST-Puffer gewaschen (3 x 10 min). Die Detektion des gebundenen sekundären Antikörpers erfolgte wie unter Punkt 2.6 (Western Blot) beschrieben.

## 2.7 Molekularbiologische Methoden

### Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA wurden Zellen von *D. hafniense* Y51 in der späten exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{578\text{ nm}} \sim 0,6$ ) durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, 16.000 xg, 10 min). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei -20°C gelagert. Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte mit dem InnuPrep Bacteria DNA Kit (Analytik Jena, Jena, D). Im Anschluss wurde eine zusätzliche RNase I-Behandlung (Sigma-Aldrich, Hamburg, D) durchgeführt. Zur Kontrolle der isolierten DNA und zum Ausschluss der Kontamination mit RNA wurde ein Aliquot der DNA mit Ladepuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 60 mM EDTA; 60% (v/v) Glycerin; 0,03% (w/v) Bromphenolblau; 0,03% (w/v) Xylencyanol) versetzt und in einem 1%igen Agarosegel (TAE; 40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA pH 8,0) elektrophoretisch aufgetrennt (1h, 70V). Die Dokumentation erfolgte am Gel Doc 2000 System (Biorad, München, D). Als Größenstandard wurden die Hyperladder I bzw. IV verwendet (Bioline, Luckenwalde, D). Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde photometrisch bestimmt (UV/Vis Cary 100 Spektrophotometer, Agilent Technologies, Böblingen, D). Die isolierte DNA wurde bei 4°C gelagert.

### Isolierung von RNA

Für die Isolierung von RNA wurden die Zellen von *D. hafniense* Y51 in der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{578\text{ nm}} \sim 0,4$ ) durch Zentrifugation sedimentiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Isolierung der gesamten RNA erfolgte unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden, D). Im Anschluss an die Extraktion wurde eine zusätzliche DNase I-Behandlung (RNase-frei, Roche, Mannheim, D) durchgeführt. Die Kontrolle der isolierten RNA, hinsichtlich der Kontamination mit DNA, erfolgte nach der Methode von Masek et al. (2005). Die RNA-Proben wurden mit 60% Formamid und Ladepuffer (5 mM Tris-HCl pH 7,6; 0,025% Bromphenolblau; 6% Glycerol) versetzt. Nach Inkubation bei 65°C (5 min) wurde 1 µl einer 1 mg/ml Ethidiumbromidlösung zugegeben und der gesamte Ansatz in einem Agarosegel (1,2% in 1x TAE; 40 mM Tris, 20 mM Acetat, 1 mM EDTA) für 30 min bei 65 V elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Dokumentation wurde das Gel Doc 2000 System (Biorad, München, D) verwendet. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde photometrisch bestimmt (UV/Vis Cary 100 Spektrophotometer, Agilent Technologies, Böblingen, D). Isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert.



Southern BlotPräparation der Gensonden

Für die Präparation der Gensonde gegen *pceA* aus *D. hafniense* Y51 wurde zunächst das Zielfragment (232 bp) per PCR amplifiziert. Der PCR-Ansatz setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

100	ng	DNA
25	pmol	je Primer
0,2	mM	je dNTP
1,25	U	Taq-Polymerase
60	mM	Tris-HCl pH 8,5
1,5	mM	MgCl <sub>2</sub>
25	mM	KCl

Primersequenzen

Primer 1      5' - GATCGTGGAT CCATGGGAGA AATCAACAGG AGGAATT - 3'

Primer 2      5' - TCTTCCGGGT CGAAAGTCTT TTCAAAG - 3'

Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Schema:

Denaturieren	2 min	96°C	} 35 Zyklen
Denaturieren	1 min	96°C	
Annealing	45 sec	53°C	
Elongation	3 min	72°C	
Elongation	10 min	72°C	

Das Ergebnis der PCR wurde in einem 1,5%igen Agarosegel überprüft. Anschließend wurde die Konzentration der PCR-Fragmente in den Ansätzen mittels Gelextraktion (Qiagen, Hilden, D) erhöht. Die Markierung der PCR-Sonden erfolgte mit Digoxigenin (DIG) gekoppelten dUTP (DIG DNA Labeling Kit; Roche, Mannheim, D). Für die Reaktion wurden 3 µg DNA in 15 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen. Nach Denaturierung der DNA (10 min 95°C) wurden 2 µl 10x Hexanukleotid-Mix, 2 µl dNTP Labeling Mix und 1 µl 2 Units/µl Klenow-Fragment zugegeben. Die Markierung der DNA erfolgte über Nacht bei 37°C. Zum Beenden der Reaktion wurden 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) zugegeben und der Ansatz für 10 min bei 65°C inkubiert.

Zur Kontrolle der Markierungseffizienz wurden verschiedene Mengen der Sonde (1 ng - 1 pg) auf eine Nylonmembran (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, D) getropft. Zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen wurde der Dot-Blot mit Blocking Solution (1 h, 1%; Roche, Mannheim, D) inkubiert. Zum Nachweis der Sonden wurden die Membranen nach 3 Waschschritten in MST-Puffer (je 10 min; 0,1 M Maleinsäure pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20) für 1 h mit Anti-Digoxigenin-Antikörpern (Fab-Fragmente; gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase; Roche, Mannheim, D) inkubiert. Nach weiteren Waschschritten (3 x 10 min mit MST-Puffer) erfolgte die Detektion gebundener Antikörper wie unter Punkt 2.6 (Proteinbiochemische Methoden, Western Blot) beschrieben.

#### *Erzeugung von DNA-Fragmenten*

Zur Erzeugung der DNA-Fragmente wurden 20 µg genomische DNA (in 26 µl bidestilliertem Wasser) mit 1 µl EcoRI (10 U/µl) und 3 µl 10x Restriktionspuffer versetzt. Der Verdau der DNA erfolgte über Nacht bei 37°C und wurde durch Inkubation für 15 min bei 65°C abgestoppt.

#### *Gelelektrophorese und Blot*

Für den Southern Blot wurden jeweils 5 µg der geschnittenen DNA in einem 0,5%igem Agarosegel (0,5x TBE; 44,5 mM Tris, 44,5 mM Borsäure, 1 mM EDTA pH 8,0) für 2 h bei 65 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard diente DIG-markierter Molekular-Gewichtsmarker (Typ VII; Roche, Mannheim, D). Zur Kontrolle der Auftrennung der DNA-Fragmente wurde das Gel in einer Ethidiumbromidlösung inkubiert (10 min; 0,5 µg/ml in 0,5x TBE). Die Dokumentation erfolgte am Gel Doc 2000 System (Biorad, München, D). Für den Transfer der DNA auf eine Nylonmembran wurde diese zuvor mit 0,5x TBE-Puffer äquilibriert. Der Blot erfolgte unter Verwendung der Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Biorad, München, D) für 30 min bei 3 mA/cm<sup>2</sup>.

#### *Denaturierung*

Für die Denaturierung der DNA wurde die Membran zunächst 5 min mit 2x SSC-Puffer (30 mM Natriumcitrat pH 7,0; 0,3 M NaCl) gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation in Denaturierungslösung (10 min; 0,4 M NaOH, 10 mM EDTA, 1,5 M NaCl). Die Membran wurde mit 2x SSC-Puffer gespült und getrocknet. Zur Fixierung der DNA auf der Membran wurde diese für 5 min mit UV-Licht (312 nm) bestrahlt.

*Prähybridisierung und Hybridisierung*

Zur Vorbereitung der Hybridisierung wurde die Membran in Prähybridisierungspuffer (2 h, 60°C) inkubiert. Der Puffer setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

5,0	x	SSC (75 mM Natriumcitrat, 0,75 M NaCl)
1,0	%	Blocking Solution (Roche, Mannheim, D)
0,1	%	Laurylsarcosin
0,02	%	SDS

Anschließend wurde der Puffer gegen Hybridisierungspuffer ausgetauscht. Dieser unterschied sich vom Prähybridisierungspuffer durch die Zugabe von 30 - 60 ng/ml der DIG-markierten Gensonde. Die Sonde wurde vor Verwendung für 10 min bei 95°C denaturiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 42°C.

*Waschschritte mit steigender Stringenz*

Zur Entfernung nicht bzw. unspezifisch gebundener Gensonden wurden mehrere Waschschritte mit steigender Stringenz nach folgendem Schema durchgeführt:

2 x 5 min	2x SSC, 0,1% SDS	Raumtemperatur
1 x 15 min	0,5x SSC, 0,1% SDS	Raumtemperatur
1 x 15 min	0,5x SSC, 0,1% SDS	42°C

*Detektion*

Die Membran wurde mit MST-Puffer gewaschen (2 min) und 1 h mit 1% Blocking Solution (Raumtemperatur) inkubiert. Anschließend wurde der Blot mit MST-Puffer gespült und 1 h bei Raumtemperatur mit 1:500 verdünnten Anti-DIG-Antikörper (0,2 - 1 µg/ml; Roche, Mannheim, D) inkubiert. Nach 2 Waschschritten mit MST-Puffer (je 5 min) wurde der 1:3000 verdünnte sekundäre Antikörper zugegeben (1,5 h; Raumtemperatur). Bei dem sekundären Antikörper handelte es sich um ein Protein G- Meerrettichperoxidase Konjugat (10 - 50 ng/ml; Pierce - Thermo Scientific, Rockford, USA) gelöst in 1x MST-Puffer. Nach 3 weiteren Waschschritten mit 1x MST-Puffer (je 10 min) erfolgte die Nachweisreaktion unter Verwendung des Super Signal West PICO Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, USA). Die Luminollösung und die Peroxidlösung wurden zu gleichen Teilen gemischt und

für 5 min auf die Membran gegeben (0,1 ml/cm<sup>2</sup>, im Dunkeln). Zur Detektion der Chemilumineszenzsignale wurde für 30 Sekunden ein Röntgenfilm (CL-Xposure Film, Thermo Scientific, Rockwood, USA) auf die Membran gelegt. Für die Entwicklung des Röntgenfilms wurde dieser für 30 Sekunden in Entwicklerlösung (GBX developer/replenisher, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) inkubiert, anschließend mit destilliertem Wasser gespült und für 30 Sekunden in Fixierlösung (GBX fixer/replenisher; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) gegeben.

#### Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Für die reverse Transkription der RNA wurde das Qiagen OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, D) verwendet. Für die Umschreibung wurden jeweils 1,25 µg RNA verwendet. Als Referenz/Kontrolle diente das Transkriptlevel des *rpoB*-Gens (DSY0463), welches für die  $\beta$ -Untereinheit der RNA-Polymerase kodiert. Die RNA (2,5 µg) wurde mit 8 µl 5x Reaktionspuffer, 2 µl Reverse Primer (25 pmol/µl, Tab. 2-7), 2 µl 10 mM dNTP-Mix und 0,25 µl RNase-Inhibitor versetzt. Der Ansatz wurde mit Wasser auf 40 µl aufgefüllt. Nach Inkubation für 10 min bei 95°C wurde der Ansatz in 2 Aliquots mit jeweils 20 µl Volumen aufgeteilt. Ein Ansatz diente als Kontrolle und blieb ohne Reverse Transkriptase. Das andere Aliquot wurde mit 1 µl Qiagen OneStep RT-PCR Enzymmix versetzt. Beide Aliquots wurden für 1 h bei 50°C inkubiert. Für die sich anschließende PCR wurden 1 µl des Forward Primers (25 pmol/µl, Tab. 2-7) und 0,2 µl Taq-Polymerase (5 U/µl, Segenetic, Borken, D) zugegeben. Der Ansatz wurde mit Wasser auf 25 µl aufgefüllt. Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Schema:

Denaturieren	15 min	96°C	} 30 Zyklen
Denaturieren	1 min	96°C	
Annealing	30 sec	50°C	
Elongation	2 min	72°C	
Elongation	10 min	72°C	

Anschließend wurde ein Aliquot der Proben in einem 1%igen Agarosegel (TAE; 1 h, 70V) aufgetrennt.

**Tabelle 2-7:** Sequenzen der Primer für die Reverse Transkriptase-PCR.

Primer	Sequenz (5' – 3')	Produkt
<i>pceA</i> _forward	ATTCGAATTT CCACTGTTGG CCTTGTT	673 bp
<i>pceA</i> _reverse	GATCGTGGAT CCATGGGAGA AATCAACAGG AGGAATT	
<i>rpoB</i> _forward	AACTTCCAGC CACCGTATTG	1376 bp
<i>rpoB</i> _reverse	AGCGATGATC TGACCTGCTT C	

Quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR)

Für die reverse Transkription der RNA wurde das Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon-Rot, D) verwendet. Für die Umschreibung wurden jeweils 1,25 µg RNA verwendet. Als Referenzgen diente *rpoB*, welches ein konstantes Expressionslevel über die Subkultivierung aufwies. Die RNA (2,5 µg) wurde mit 1 µl des jeweiligen Reverse Primers (10 pmol/µl; Tab. 2-8) versetzt und der Ansatz mit Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Nach Inkubation für 5 min bei 65°C wurden 4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl RNase-Inhibitor und 2 µl 10 mM dNTP-Mix hinzugefügt. Der Ansatz wurde in 2 Aliquots mit je 9,5 µl Volumen aufgeteilt. Ein Aliquot diente als Kontrolle ohne reverse Transkriptase, dem anderen Aliquot wurde 0,5 µl Reverse Transkriptase (200 Units/µl) zugegeben. Beide Aliquots wurden für 1 h bei 45°C inkubiert und die Reaktion anschließend bei 70°C (5 min) abgestoppt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C. Für die anschließende quantitative PCR wurde der 2x Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas, St- Leon-Rot, D) verwendet. Es erfolgte jeweils eine Dreifachbestimmung der Transkriptlevel. Der Reaktionsansatz (10 µl) setzt sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

0,8	µl	cDNA
1	x	Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix
0,4	pmol	je Primer (siehe Tab. 2-8)

Die Quantifizierung wurde am CFX96 Real-Time PCR System (Bio-Rad, München, D) durchgeführt. Die quantitative PCR erfolgte in 96-Well-Platten (Starlab, Hamburg, D), die mit selbstklebenden Folien (Starlab, Hamburg, D) verschlossen wurden. Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Schema:

Denaturieren	10	min	95°C	} 40 Zyklen
Denaturieren	15	sek	95°C	
Annealing	30	sek	60°C	
Elongation	30	sek	72°C	

Die Aufnahme der Daten erfolgte im Anschluss an die Elongationphase jedes Zyklus. Am Ende des Programmes wurde zur Spezifikation der PCR Produkte eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Zudem wurde ein Aliquot des PCR-Ansatzes in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Analyse der Daten erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode (Livak et al. 2001). Als Kalibrator diente die cDNA von *D. hafniense* Y51 Zellen, die in Anwesenheit von PCE kultiviert wurden. Für jedes der betrachteten Gene wurde die PCR-Effizienz bestimmt und bei der Berechnung des relativen Transkriptlevel berücksichtigt. Die PCR-Effizienzen lagen im Bereich von 95 - 98%. Bei jeder PCR wurden sogenannte „no template“- Kontrollen mitgeführt. Dabei handelte es sich um RNA-Proben, bei denen keine cDNA-Synthese durchgeführt wurde (siehe oben). Die  $C_t$ -Werte der Proben mit der geringsten Template-Konzentration und die der Kontrollen unterschieden sich stets um mindestens 7 Zyklen.

**Tabelle 2-8:** Sequenzen der Primer für die quantitative Reverse Transkriptase-PCR.

Primer	Sequenz (5' – 3')	Produkt
<i>pceA</i> _forward	GGAGTGTAAT CCGCTTTAT C	136 bp
<i>pceA</i> _reverse	AATTTCCACT GTTGGCCTTG T	
<i>rpoB</i> _forward	GATTCGGGCT TTGGGTATG C	138 bp
<i>rpoB</i> _reverse	CGCAGACGCT TGTAGATTTC C	
<i>btuF</i> _forward	GCAAAGGAAC AGGCCATTGC CGATA	142 bp
<i>btuF</i> _reverse	TGCCACCTGC TTTGGTGATG AGTTC	
<i>cbiE</i> _forward	GAAGCGGAGC ATAAGCCGGA ACAAT	106 bp
<i>cbiE</i> _reverse	TCTCCGTCTT GGTCATGGGG ACATC	
<i>cobT</i> _forward	CTGGAAGCCC TCGCCAAACA	134 bp
<i>cobT</i> _reverse	ACTTCCTGAG GGAAGGCACT GA	

### Quantitative PCR

Die Methode der quantitativen PCR wurde verwendet, um das Genlevel von *pceA* bzw. des Referenzgens *rpoB* in den Zellen von *D. hafniense* Y51 zu bestimmen. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 2-8 zusammengefasst. Die Isolierung der DNA erfolgte wie oben beschrieben. Die PCR wurde wie unter „Quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR)“ durchgeführt. Statt 0,8 µl cDNA wurde dem Reaktionsansatz 25 ng DNA zugegeben. Für „no template“-Kontrollen wurde dem Reaktionsansatz Wasser

anstelle von DNA zugegeben. Die Analyse der Daten erfolgte wie bereits beschrieben nach der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode (Livak et al. 2001).

### Sequenzierung

Für die Sequenzierung von Genfragmenten der dechlorierenden bzw. der nicht-dechlorierenden Varianten von *D. hafniense* Y51 wurde genomische DNA der Klone, wie unter Punkt „Isolation genomischer DNA“ beschrieben, isoliert. Unter Verwendung dieser erfolgte die Amplifikation des Zielfragmentes (Mastercycler personal, Eppendorf, Hamburg, D).

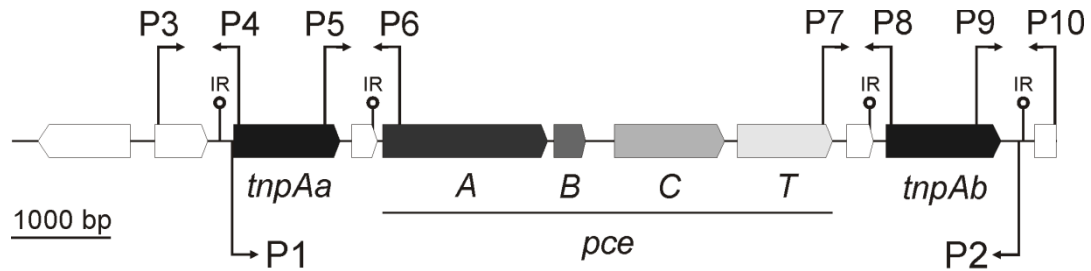
Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

100	ng	DNA
10	pmol	je Primer
0,2	mM	je dNTP
1,25	U	Pfu-Polymerase
20	mM	Tris-HCl pH 8,8
10	mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
2	mM	MgSO <sub>4</sub>
10	mM	KCl

Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Schema:

Denaturieren	5	min	95°C	} 35 Zyklen
Denaturieren	30	sek	95°C	
Annealing	30	sek	60°C	
Elongation	3	min	72°C	
Elongation	10	min	72°C	

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in einem 1%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt und per Gelextraktion (Zymo Research, Irvine, USA) aus dem Gel isoliert und gereinigt. Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte durch die GATC Biotech AG (Konstanz, D). In Abbildung 2-2 sind die Positionen der Primer im *pce*-Gencluster von *D. hafniense* Y51 vermerkt. Die Sequenzen und Größen der Amplifikate sind in Tabelle 2-9 zusammengefasst.



**Abbildung 2-2:** Position der verwendeten Sequenzier-Primer im *pce*-Gencluster von *D. hafniense* Y51. *tnp* - Transposase, IR - Inverted Repeat.

**Tabelle 2-9:** Sequenzen der Primer für die molekularbiologische Analyse der verschiedenen Varianten von *D. hafniense* Y51.

Primer	Sequenz (5' – 3')	Produktgröße	Verwendung für
P1	CGATGGTTAC CCAAATTCTA CCGTAC	~ 5,2 kbp <sup>a</sup>	nicht- dechlorierende Varianten
P2	GGAAGAGTGT CAAGGGTGAT GCGAGGG	~ 1,6 kbp <sup>b</sup>	
P3	CGGTCATGGG TGACACCC	842 bp	dechlorierende Varianten
P4	TCAGCCTTTC GCAGAGCC		
P5	AGAAGGGTTG GAAGACTC	794 bp	dechlorierende Varianten
P6	TTGTAACGCT GGTACTTTGC GTCCACC		
P7	CGAAAGCCGA CAAAACGG	720 bp	dechlorierende Varianten
P8	TCAGCCTTTC GCAGAGCC		
P9	AGAAGGGTTG GAAGACTC	819 bp	dechlorierende Varianten
P10	TTCACTGTCA GCCGCAGGCT		

<sup>a</sup> bei vollständigem *pce*-Gencluster.

<sup>b</sup> bei Verlust von *pceABCT* und einer Transposase.



## 2.8 Elektronenmikroskopische Methoden

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen an *D. hafniense* Y51 erfolgten am Elektronenmikroskopischen Zentrum des Universitätsklinikums Jena in Kooperation mit Dr. Martin Westermann.

### Gefrierbruch Replika Immungoldmarkierung (FRIL)

#### *Gefrierbruch*

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von PceA, PceB und PceT wurden chemisch unfixierte Zellen von *D. hafniense* Y51 in der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{578\text{ nm}} \sim 0,4 - 0,6$ ) abzentrifugiert (10 min, 4.600 xg, Raumtemperatur). Die sedimentierten Zellen wurden mindestens zweimal mit anaerobem substratfreiem Medium (Basalmedium mit 0,02% Hefeextrakt) gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 200 - 500  $\mu\text{l}$  substratfreiem Medium resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung in anaeroben Serumflaschen gelagert (28°C, max. 60 min). Für den Gefrierbruch wurden 1 - 2  $\mu\text{l}$  Zellsuspension zwischen 2 Sandwich-Kupferträger eingebracht und in einem Ethan-Propan-Gemisch (1:2), das mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, schnell eingefroren (2000 – 4000 K/s). Der Aufbruch der Zellen erfolgte in der Gefrierbruchanlage BAF400T (BAL-TEC AG Balzers, Liechtenstein) bei -150°C im Hochvakuum ( $10^{-6}$  Pa, Severs 2007). Sofort nach dem Aufbruch der Zellen wurden die Präparate mit einer Kontrast-gebenden Platin- (2 nm Dicke, Winkel 35°) und einer stabilisierenden Kohlenstoffschicht (20 nm Dicke, Winkel 90°) bedampft und damit Abdrücke (Replika) der Bruchflächen erzeugt (Schlörmann et al. 2007).

#### *Immungoldmarkierung*

Die Replika wurden nach der Bedampfung in eine LysozymbLösung (5 mg/ml; 30 min; 37°C) und anschließend über Nacht in eine Waschlösung (2,5% (w/v) SDS; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 30 mM Saccharose) gegeben (Fujimoto 1997). Die Replika wurden mit PBS-Puffer (75 mM NaCl, 12,5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 67 mM  $\text{NaHPO}_4$  pH 7,2) gewaschen und für 30 Minuten mit LBB-Puffer („Labeling Blocking Buffer“: 1% BSA, 0,5% Gelatine, 0,005% Tween) inkubiert. Die Markierung mit primären Antikörper (antiPceA: 1:50 verdünnt, antiPceB: 1:1000 verdünnt, antiPceT: 1:1000 verdünnt) erfolgte in LBB-Puffer über Nacht. Nach 4 weiteren Waschschritten mit LBB-Puffer wurde der 1:50 verdünnte sekundäre Antikörper (Anti-Kaninchen-Antikörper, British Biocell International, Cardiff, UK) zugegeben. Dieser

Antikörper war an einen 10 nm großen, stark Elektronen-streuenden Goldpartikel gekoppelt, welcher die Detektion des Zielproteins im Elektronenmikroskop ermöglicht. Darauf folgend wurden die Replika mit PBS-Puffer gewaschen (4 x 10 min) und die gebundenen Antikörper mit Glutaraldehyd (0,5%; 10 min) an Replika fixiert. Zuletzt wurden die Replika mit destilliertem Wasser gespült (2x) und auf unbefilmte 300-Maschen EM-Netzchen aufgefischt. Die Analyse und Bilddokumentation erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop (EM 902A, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D) mit einer 1k FastScann CCD-Kamera (TVIPS GmbH, München, D).

### Rasterelektronenmikroskopie

Zellen von *D. hafniense* Y51 wurden in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von PCE ohne externe Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle kultiviert (10 Subkulturen, 10% Inokulum). Bei einer optischen Dichte (578 nm) von ~ 0,6 wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 4.600 xg, Raumtemperatur). Die Zellen wurden mit substratfreiem Medium (Basalmedium mit 0,02% Hefeextrakt) gewaschen und anschließend durch Zugabe von 2,5% Glutaraldehyd (in 0,1 M Cacodylat-Puffer pH 7,2) fixiert (1 h, Raumtemperatur). Die Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen übertragen (2 h, Raumtemperatur). Überflüssige Zellsuspension wurde vorsichtig entfernt und die Deckgläschen mit 0,1 M Cacodylat-Puffer gewaschen (3 x 15 min). Die Zellen wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30, 50, 70, 80, 90, 100%; jeweils 15 min) entwässert und einer Kritisch-Punkt-Trocknung unterzogen (Kritisch-Punkt-Trockner CPD 030, BAL-TEC AG Balzers, Liechtenstein). Nach dem Gold-Sputter-Coating (Sputter-Coater SCD 005, BAL-TEC AG Balzers, Liechtenstein) wurden die Zellen am Rasterelektronenmikroskop (LEO, 1530 Gemini, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D) bei 8 kV Beschleunigungsspannung und 17 mm Arbeitsabstand analysiert und dokumentiert.

## 2.9 Bioinformatische Methoden

### Phylogenetische Analysen

Die Identifikation mutmaßlicher Membrananker-Proteine für reduktive Dehalogenasen erfolgte mittels BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al. 1990) basierend auf bekannten Proteinsequenzen. Als Template dienten PceB bzw. RdhB Proteine aus *D. hafniense* Y51, *S. multivorans* und *Dehalococcoides mccartyi* 195. Die erhaltenen Proteinsequenzen sind im Anhang der Arbeit hinterlegt. Für das Alignment der Sequenzen wurde das Programm ClustalW (Larkin et al. 2007) verwendet. Die Erstellung des phylogenetischen Stammbaums erfolgte mit dem Programm MEGA 5.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analyses; Tamura et al. 2011). Für die Analyse wurde der Maximum Likelihood-Algorithmus verwendet. Zum Vergleich wurde ebenfalls der Neighbor Joining-Algorithmus genutzt. Die Bootstrap-Methode wurde zur Überprüfung der Phylogenie verwendet. Die Zahl der Wiederholungen betrug 1000.

### Strukturanalysen

Für die Strukturanalyse der verschiedenen RdhB-Proteine wurden folgende Programme verwendet: TMHMM 2.0 (Sonnhammer 1998), SOSUI (Hirokawa et al. 1998) und TMPred (Hofmann et al. 1993). Die Analyse erfolgte für folgende RdhB-Proteine: YP\_519071.1 (*Desulfitobacterium hafniense* Y51), AAC60789.1 (*Sulfurospirillum multivorans*), CAD28791.1 (*Dehalobacter restrictus*) und AAW39061.1 (*Dehalococcoides mccartyi* 195). Zur Bestimmung der Hydrophobizität der Proteine wurden die jeweiligen GRAVY-Werte bestimmt (Kyte et al. 1982). Dies erfolgte mit Hilfe des SIB ExPASy Bioinformatics Resources Portals (Artimo et al. 2012) und der Anwendung „ProtParam“.

Zur Ermittlung der konservierten Sequenzbereiche des exoplasmatischen Loops der RdhB-Proteine verschiedener zur Dechlorierung befähigter Mikroorganismen wurde ein Alignment der Proteinsequenzen dieser Loops mittels ClustalW durchgeführt. Für die graphische Darstellung der konservierten Proteinsequenz wurde das Programm „Weblogo 2.8.2“ verwendet (Schneider et al. 1990, Crooks et al. 2004).

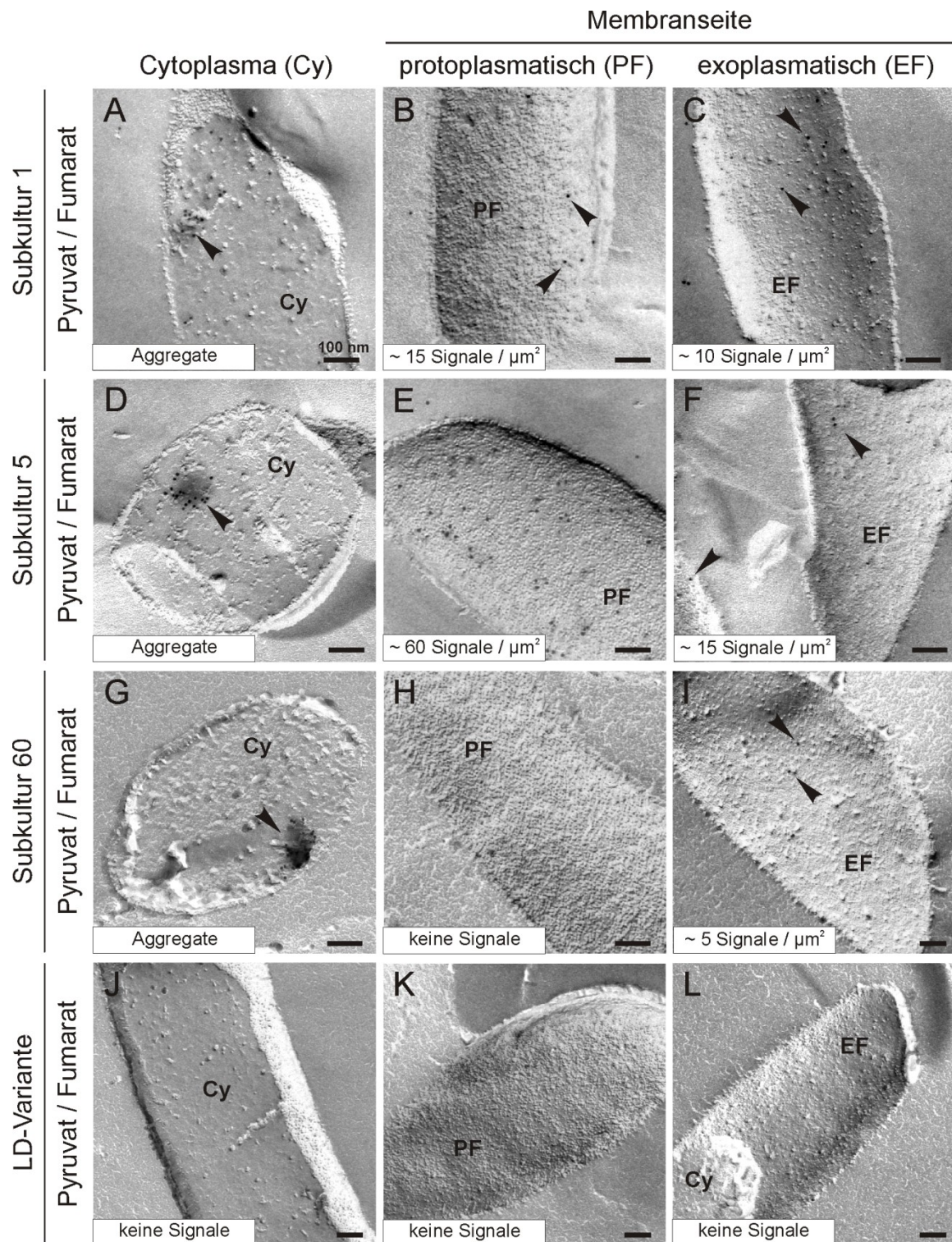
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Aggregation der PCE-Dehalogenase (PceA) in Abwesenheit von PCE

Die reduktive PCE-Dehalogenase (PceA) in *Desulfitobacterium hafniense* Y51 weist eine substratabhängige subzelluläre Lokalisation auf (Reinhold 2008, Reinhold et al. 2012). In Anwesenheit des Enzymsubstrates Tetrachlorethen (PCE) lässt sich PceA löslich sowohl im Cytoplasma als auch im Exoplasma der Zellen nachweisen. In Abwesenheit von PCE kommt es hingegen zu einer Aggregation von PceA im Cytoplasma der Zellen (nach 15 Subkulturen mit jeweils 10% Inokulum). Dieses Phänomen wurde bisher nur bei *D. hafniense* Y51 bzw. bei dem nah verwandten Stamm PCE-S beobachtet.

Die Aggregation der PCE-Dehalogenase wurde bislang nur nach Kultivierung für 15 Subkulturen in Abwesenheit von PCE, mit Fumarat als alternativem Elektronenakzeptor, beobachtet. Die dafür untersuchte Kultur von *D. hafniense* Y51 zeichnete sich durch eine kontinuierliche Bildung des PceA-Proteins über 60 Subkulturen aus. Der komplette Verlust der dechlorierenden Aktivität wurde jedoch bereits nach ungefähr 35 Subkulturen festgestellt (LZK 1, siehe Material und Methoden). Die elektronenmikroskopische Analyse der Subkulturen 1, 5 bzw. 60 dieser Kultivierung sollte Aufschluss über den Beginn und die Dynamik des Aggregationsprozesses geben. Zudem sollte eine Aussage über die Stabilität der Aggregate getroffen werden.

Die Aggregation von PceA im Cytoplasma der Zellen wurde bereits nach einer Subkultivierung in Abwesenheit von PCE beobachtet (Abb. 3-1 A-C). Durch die SDS-Behandlung der Replika löst sich die Struktur der Aggregate auf, weshalb diese lediglich als undefinierte elektronendichte Bereiche in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen sind. Die Anzahl der Zellen mit solchen Aggregaten steigerte sich mit zunehmender Subkultivierungsdauer in Abwesenheit von PCE. Bereits nach 5 Subkulturen konnte die Aggregation von PceA in vielen Zellen der Kultur nachgewiesen werden (Abb. 3-1 D-F). Da auch nach 60 Subkulturen PceA-Aggregate detektiert wurden (Abb. 3-1 G), konnte von einer hohen Stabilität derselben über die Langzeitkultivierung (LZK1) ausgegangen werden. Auf der protoplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran ließ sich nur in den Subkulturen 1 und 5 freies PceA-Protein nachweisen (Abb. 3-1 B, E), jedoch nicht in Subkultur 60 (Abb. 3-1 H). Auf der exoplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran ließen sich stets geringe Mengen an PceA nachweisen (Abb. 3-1 C, F, I). Dabei könnte es sich, vor allem bei Subkultur 60, um



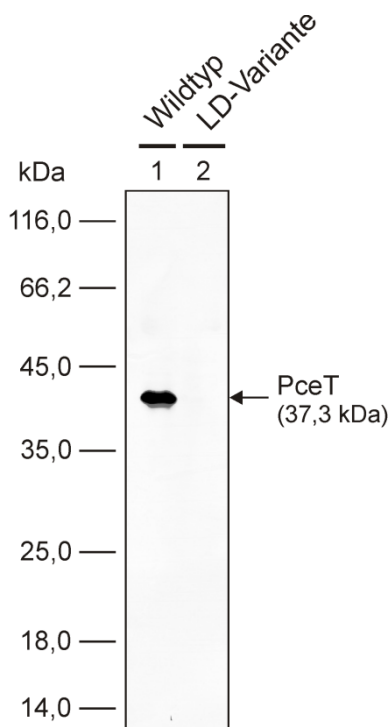
**Abbildung 3-1:** Subzelluläre Lokalisation von PceA in *D. hafniense* Y51 (A-I) und in der „Large Deletion“ (LD)-Variante (J-L) analysiert per Elektronenmikroskopie nach Gefrierbruch der Zellen und Immungoldmarkierung (FRIL) von PceA. Die Kultivierung erfolgte für 1 Subkultur (A-C), 5 Subkulturen (D-F) bzw. 60 Subkulturen (G-I) in Abwesenheit von PCE mit 30 nM Cyanocobalamin als externe Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle. Die Zellen der LD-Variante wurden mit Pyruvat und Fumarat kultiviert (mit externem Vitamin B<sub>12</sub> im Medium). Die Abbildungen zeigen Gefrierbrüche durch das Cytoplasma (Cy), die protoplasmatische Bruchfläche (PF) und die exoplasmatische Bruchfläche (EF) der Cytoplasmamembran. Die Skalen in den Abbildungen entsprechen jeweils 100 nm.

Präparationartefakte handeln, da zu diesem Zeitpunkt keine PceA-Aktivität nachweisbar war. Dies spricht gegen die Bildung funktionsfähiger, im Exoplasma lokalisierter PCE-Dehalogenase.

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der „Large Deletion“ (LD)-Variante von *D. hafniense* Y51, welche sich durch einen kompletten Verlust des *pce*-Genclusters auszeichnet (Futagami et al. 2008), ließen sich keine Proteinaggregate im Cytoplasma der Zellen nachweisen (Abb. 3-1 J, K, L). Folglich ist es nicht sehr wahrscheinlich, dass es sich bei den Aggregaten um Proteinansammlungen handelt, an deren Oberfläche sich PceA-Moleküle lediglich anlagern.

#### *Subzelluläre Lokalisation des mutmaßlichen Chaperons PceT*

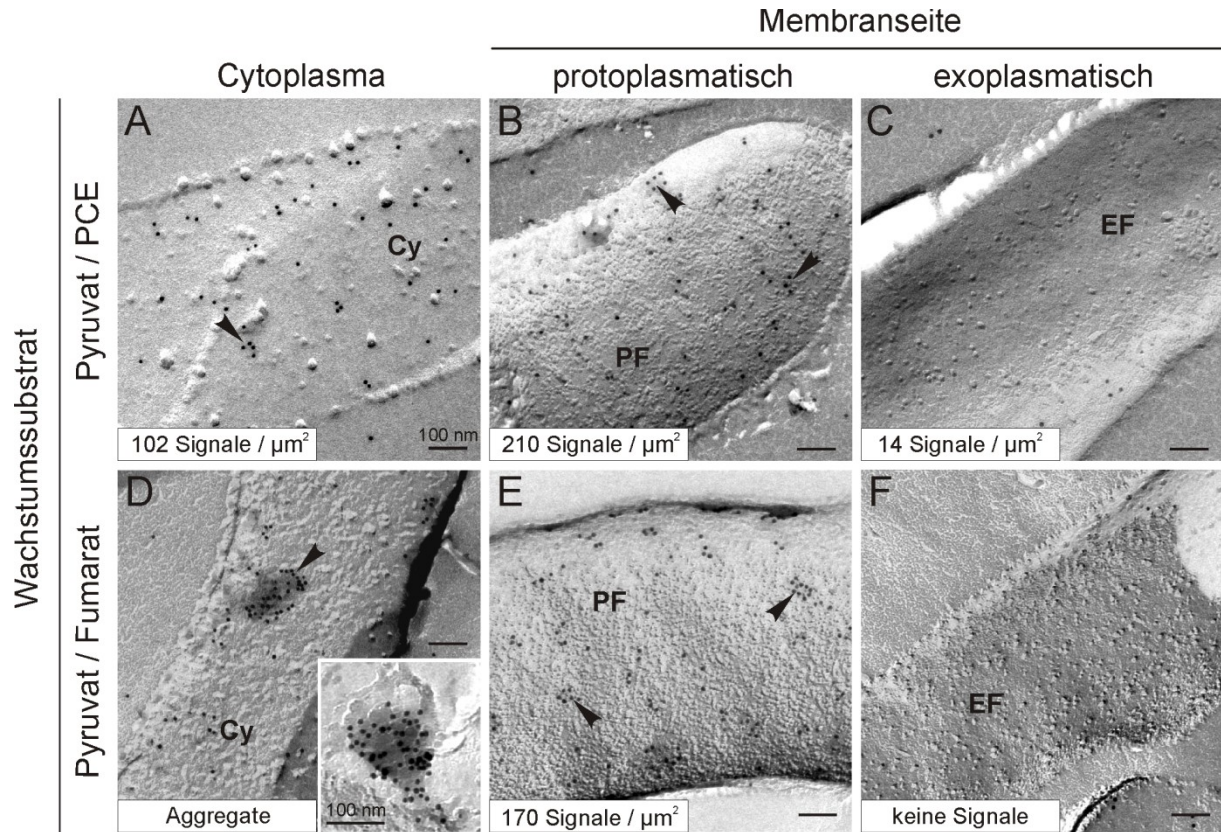
Die Funktion von PceT als mutmaßliches Chaperon und dessen Bindung an die Vorläuferform der PCE-Dehalogenase, präPceA, lassen PceT bei dem Reifungsprozess der PCE-Dehalogenase eine wichtige Rolle zukommen (Morita et al. 2009). Daraufhin wurde die subzelluläre Lokalisation von PceT in der bereits beschriebenen Subkultivierung von *D. hafniense* Y51 in Anwesenheit von PCE (LZK 2, Subkultur 15; Reinhold 2008) bzw. Abwesenheit von PCE (LZK 1, Subkultur 15; Reinhold 2008) untersucht. Zum Nachweis von PceT wurde ein Antikörper verwendet, dessen Spezifität zunächst per Immunoblot getestet wurde (Abb. 3-2). Hierfür wurden Zellextrakte von *D. hafniense* Y51 bzw. der LD-Variante des Stammes untersucht. In beiden Zellextrakten wurde neben der Reaktion mit PceT keine Kreuzreaktion mit anderen Proteinen beobachtet.



**Abbildung 3-2:** Nachweis der Spezifität des Antikörpers zur Detektion von PceT in Zellen von *D. hafniense* Y51 mittels Immunoblot. Als Kontrolle dienten Zellen der „Large Deletion“ (LD)-Variante des Stammes. Pro Spur wurden 5 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Zellen des Wildtyps wurden in Anwesenheit von PCE kultiviert. Die Zellen der LD-Variante wurden mit Pyruvat und Fumarat als Substrate kultiviert.



Die Analyse der subzellulären Lokalisation von PceT in Zellen von *D. hafniense* Y51 zeigte, dass PceT vornehmlich im Cytoplasma lokalisiert ist (Abb. 3-3). Dies wurde sowohl bei Kultivierung in Anwesenheit von PCE (Abb. 3-3 A-C) als auch in Abwesenheit von PCE (Abb. 3-3 D-F) gezeigt.



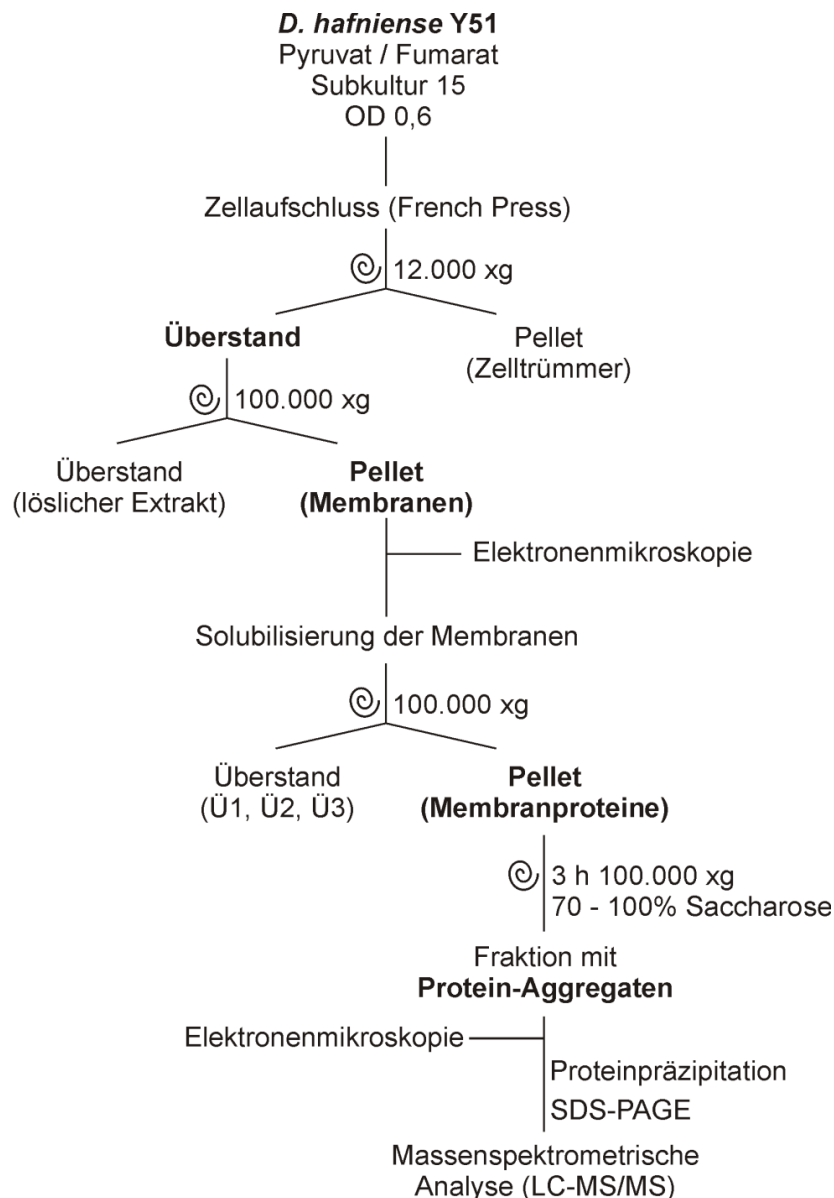
**Abbildung 3-3:** Subzelluläre Lokalisation von PceT in *D. hafniense* Y51 analysiert per Elektronenmikroskopie nach Gefrierbruch der Zellen und Immungoldmarkierung (FRIL) von PceT. Die Zellen wurden für 15 Subkulturen in Anwesenheit von PCE (A-C) bzw. in Abwesenheit von PCE (D-F) kultiviert. Als alternativer Elektronenakzeptor diente Fumarat. Dem Medium wurden 30 nM Cyanocobalamin als externe Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle zugegeben. Die Abbildungen zeigen Gefrierbrüche durch das Cytoplasma (Cy), die protoplasmatische Bruchfläche (PF) und die exoplasmatische Bruchfläche (EF) der Cytoplasmamembran. Die Skalen in den Abbildungen entsprechen jeweils 100 nm.

Hervorzuheben ist, dass es bei Kultivierung in Abwesenheit von PCE, wie im Falle der PCE-Dehalogenase, zu einer Aggregation von PceT im Cytoplasma der Zellen kam (Abb. 3-3 D). Bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Zellen wurde jeweils nur ein Proteinaggregat pro Zelle gefunden, was eine gemeinsame Lokalisation von PceA und PceT in diesen Aggregaten vermuten lässt. Für die Untersuchung der Co-Lokalisation beider Proteine in Aggregat-haltigen Zellen von *D. hafniense* Y51 (LZK1, Subkultur 15) wurden ein eigens in Ratten produzierter PceA-Antikörper (produziert entsprechend dem Protokoll von Hinz 2007) und der aus Kaninchen stammende PceT-Antikörper (siehe 2.6 bzw. Abb. 3-2)

verwendet. Der Nachweis der Bindung dieser Antikörper erfolgte wie bereits beschrieben mit goldpartikel-gekoppelten sekundären Antikörpern (siehe 2.8). Hierbei wurden jeweils unterschiedlich große Goldpartikel verwendet, um eine Unterscheidung beider Antikörper in elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu ermöglichen. Die Analyse zeigte jedoch keine eindeutige Co-Lokalisation von PceA und PceT in den Zellen von *D. hafniense* Y51 (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.1 Isolierung der PceA-Aggregate

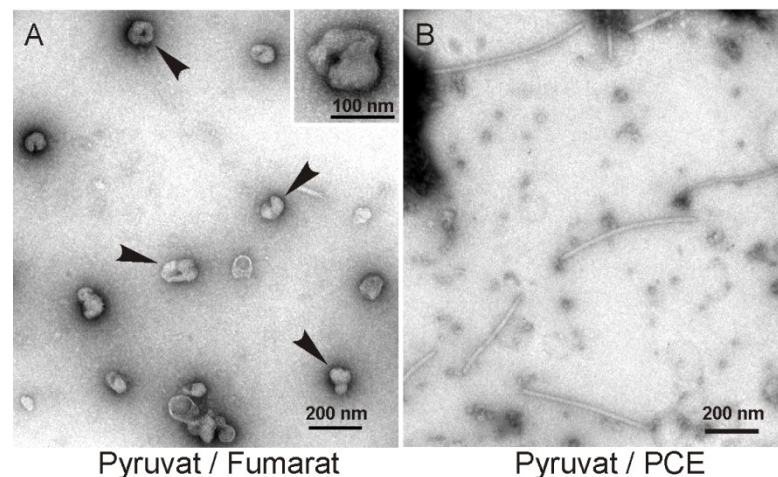
Die Voraussetzung für eine weitere Charakterisierung der PceA-Aggregate war die Isolierung und Reinigung dieser aus Zellen von *D. hafniense* Y51. Dafür wurde zunächst anhand der bisher gewonnenen Erkenntnisse über die Eigenschaften der PceA-Aggregate eine Reinigungsstrategie (Abb. 3-4) entwickelt.



**Abbildung 3-4:** Schema zur Reinigung der PceA-Aggregate aus Zellen von *D. hafniense* Y51 (für Details siehe Text).

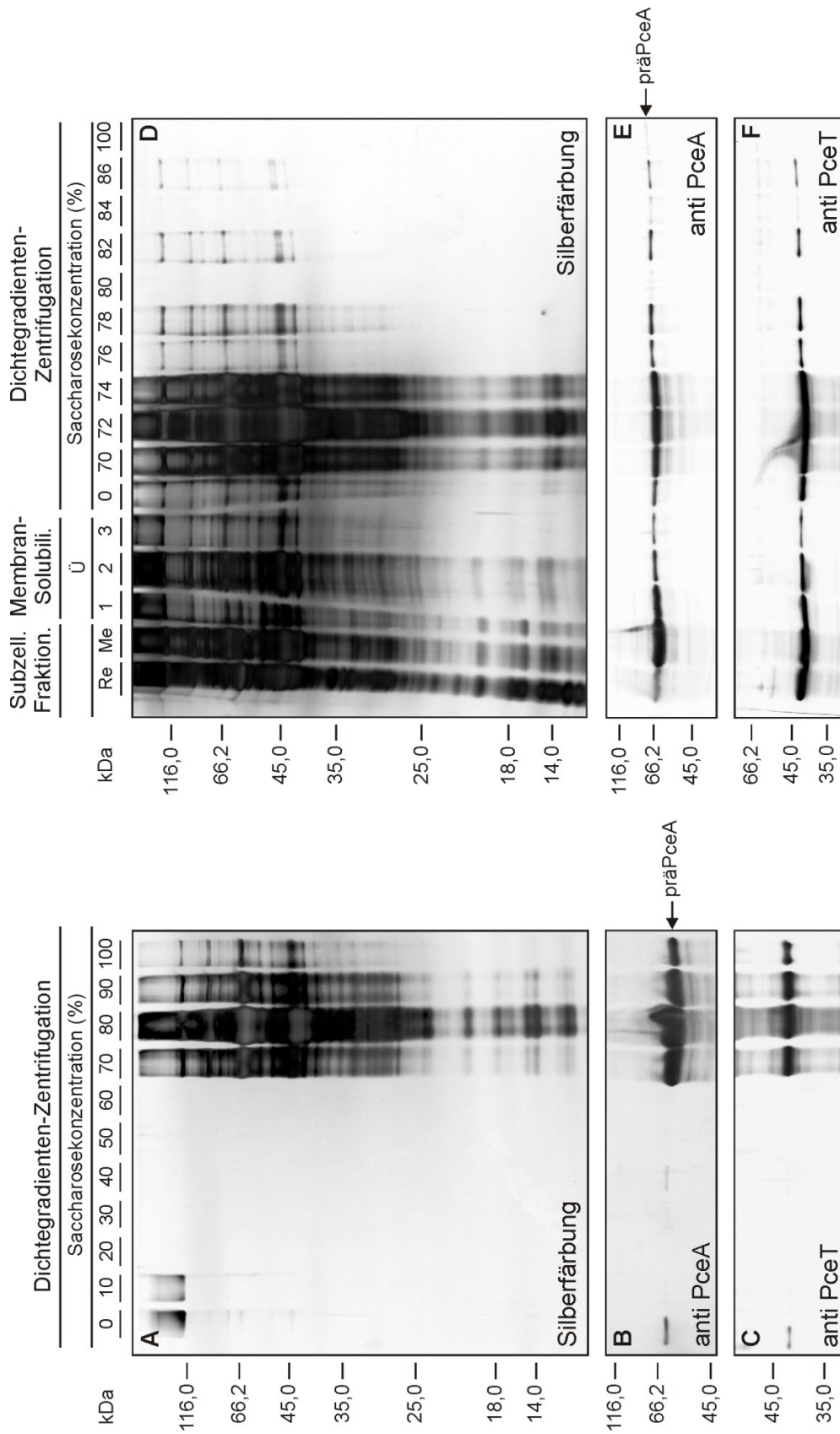


Im ersten Schritt der Reinigung wurden die Membranen der Zellen präpariert, da frühere Untersuchungen zeigten, dass sich die PceA-Aggregate zusammen mit den Membranen anreichern lassen (Reinhold 2008). Dafür wurden die Zellen von *D. hafniense* Y51 (LZK1, Subkultur 15) aufgeschlossen und eine differentielle Zentrifugation durchgeführt. Die elektronenmikroskopische Analyse der erhaltenen Membranfraktion bestätigte die Anwesenheit von Protein-Aggregaten (Abb. 3-5 A). Zudem zeigte die immunologische Analyse dieser Membranfraktion die Anwesenheit von präPceA (PceA mit Signalpeptid), welches sich aufgrund des höheren Molekulargewichts eindeutig von der reifen Form - PceA - unterscheiden lässt. (Abb. 3-6 E). Im Gegensatz dazu wurden in der Membranfraktion von Zellen, die in Anwesenheit von PCE kultiviert wurden (LZK2), keinerlei Protein-Aggregate nachgewiesen (Abb. 3-5 B).



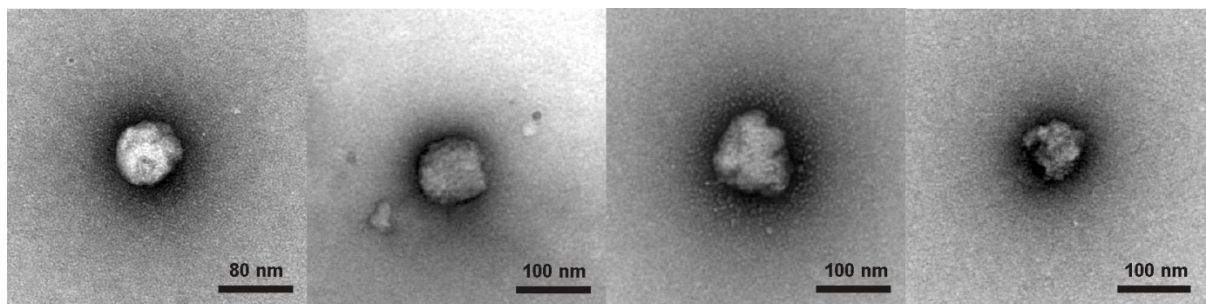
**Abbildung 3-5:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von Protein-Aggregaten in der Membranfraktion von *D. hafniense* Y51-Zellen kultiviert in Abwesenheit von PCE (A). Als Kontrolle diente die Membranfraktion von Zellen, die in Anwesenheit von PCE kultiviert wurden (B).

Im zweiten Schritt der Reinigung wurden die Membranen solubilisiert. Bei anschließender Zentrifugation sedimentierten sowohl die Protein-Aggregate als auch weitere membran-integrale bzw. membran-assoziierte Proteine, wohingegen die solubilisierten Membranreste im Überstand blieben. Die Analyse der erhaltenen Überstände (Abb. 3-6 D-F) zeigte, dass diese neben den Membranresten auch Proteine enthielten. Der Immunoblot zeigte jedoch, dass es sich bei diesen Proteinen nur zu einem geringen Teil um PceA bzw. PceT handelt.



**Abbildung 3-6:** Verfolgung der Reinigung der PceA-Aggregate aus *D. hafniense* Y51 per SDS-PAGE. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte in einem Saccharosegradienten im Bereich von 0 - 100% Saccharose (A-C) bzw. von 70 - 100% Saccharose (D-F). Für den Nachweis der Proteine per Silberfärbung wurden 2 µl jeder Fraktion nach erfolgter Proteinfällung bzw. 1 µg Gesamtprotein des Rohextraktes (Re) und der Membranfraktion (Me) aufgetragen. Für den immunologische Nachweis von PceA (B, E) bzw. PceT (C, F) wurden pro Spur 5 µl jeder Fraktion bzw. 5 µg Gesamtprotein für „Re“ und „Me“ aufgetragen. Subzell. Fraktion. - Subzelluläre Fraktionierung, Solubili. - Solubilisierung.

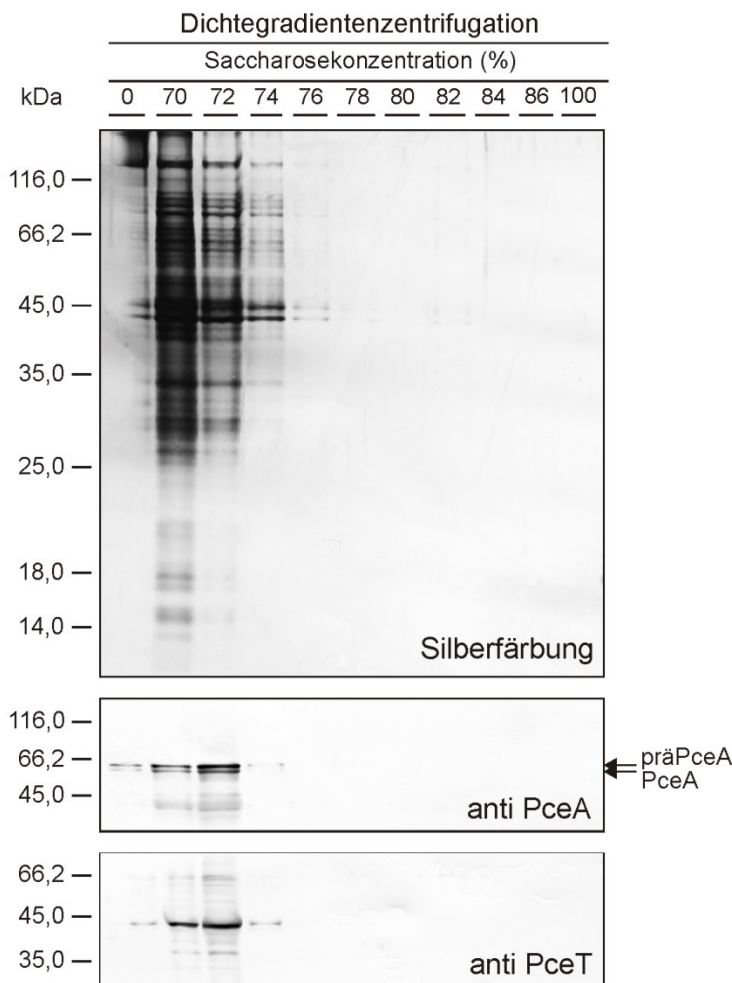
Die Dichtegradienten-Zentrifugation der isolierten Proteine bzw. Proteinkomplexe unter Verwendung eines diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten stellte den dritten Schritt der Reinigung dar. Hier erfolgte die Auftrennung der Proteine bzw. Proteinkomplexe nach ihrem Molekulargewicht. Große Proteinkomplexe sollten sich bei hohen Saccharose-Konzentrationen anreichern, während kleine Proteine bei niedriger Saccharose-Konzentration nachweisbar sein sollten. Erste Versuche zeigten, dass sowohl PceA als auch PceT vor allem im Bereich von 70 - 100% (w/v) Saccharose vorhanden waren (Abb. 3-6 A-C), was auf die Präsenz der Protein-Aggregate in diesen Fraktionen hindeutet. Daraufhin wurde der Saccharosegradient in diesem Bereich verfeinert, um eine effektivere Auftrennung der Proteine zu ermöglichen (Abb. 3-6 D-F). Eine große Anzahl von Proteinen, darunter auch PceA und PceT, konnte im Bereich von 70 - 74% Saccharose detektiert werden. Für die weitere Analyse wurde entsprechend der SDS-PAGE, die Fraktion mit dem höchsten Reinigungsgrad bei 86% (w/v) Saccharose verwendet, da hier die Wahrscheinlichkeit der Kontamination mit Fremdproteinen am geringsten erschien. In dieser Fraktion konnten neben präPceA (Abb. 3-6 E) und PceT (Abb. 3-6 F) nur eine geringe Anzahl weiterer Proteine nachgewiesen werden (Abb. 3-6 D). Die elektronenmikroskopische Analyse dieser Fraktion zeigte abermals die Anwesenheit von Protein-Aggregaten (Abb. 3-7). Eine Markierung dieser Partikel mit PceA bzw. PceT-spezifischen Antikörpern lieferte keine eindeutigen Ergebnisse, da die natürliche Struktur der Aggregate möglicherweise die Bindung der Antikörper beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3-7:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen der gereinigten PceA-Aggregate aus *D. hafniense* Y51 in der 86%igen Saccharose-Fraktion.

In einem Kontrollexperiment wurde die vollständige Isolierungs- und Reinigungsprozedur mit Zellen von *D. hafniense* Y51 durchgeführt, die in Anwesenheit von PCE kultiviert wurden (Abb. 3-8). Bereits in der präparierten Membranfraktion waren keine Protein-Aggregate vorhanden (Abb. 3-5). Bei Auftrennung der isolierten Membranproteine in einem Saccharosegradienten von 70 - 100% wurde PceA bis zu der Fraktion mit 76% Saccharose nachgewiesen (Abb. 3-8). In der verwendeten Fraktion mit 86% Saccharose

konnten im Silbergel keine Proteine detektiert werden. Im Gegensatz zur Kultivierung in Abwesenheit von PCE wurden in diesen Zellen beide Formen, die Vorläuferform und die gereifte Form der PCE-Dehalogenase, nachgewiesen (Abb. 3-8).



**Abbildung 3-8:** SDS-PAGE zur Verfolgung der Reinigung isolierter membran-assoziiierter Proteine aus Zellen von *D. hafniense* Y51 kultiviert in Anwesenheit von PCE. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem Gradienten von 70 - 100% (w/v) Saccharose. Für den Nachweis der Proteine per Silberfärbung wurden 2 µl jeder Fraktion nach erfolgter Proteinfällung aufgetragen. Für den immunologischen Nachweis von PceA bzw. PceT wurden pro Spur 5 µl jeder Fraktion aufgetragen.

### 3.1.2 Charakterisierung der PceA-Aggregate

#### Größe der PceA-Aggregate

Zur Bestimmung der Größe der PceA-Aggregate wurden die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen dokumentierten Protein-Aggregate mithilfe der Software „Image J“ (Abramoff et al. 2004) gemessen. Dies konnte nur anhand der gereinigten Aggregate erfolgen, da bei immunmarkierten Gefrierbrüchen durch die notwendige SDS-Behandlung der Replika die native Struktur der Aggregate aufgelöst wird. Dadurch wird die tatsächliche Größe der Aggregate verfälscht. Da die Form und Größe der Protein-Aggregate variierte, wurden jeweils eine minimale und eine maximale Größe angegeben.

In Abwesenheit von PCE (LZK1, Subkultur 15) besitzen die Aggregate in den Zellen von *D. hafniense* Y51 einen maximalen Durchmesser von ungefähr 150 nm (Tab. 3-1). Die

durchschnittliche Größe einer Zelle dieses Stammes liegt bei einer Länge von 5 - 7  $\mu\text{m}$  und einem Durchmesser von 0,5  $\mu\text{m}$  (Villemur et al. 2006). Bei anschließendem Transfer der auf Pyruvat und Fumarat kultivierten Zellen auf ein PCE-haltiges Medium reduzierte sich die Anzahl der Aggregate, weshalb weniger Aggregate vermessen werden konnten. Zum anderen ist auch eine Verringerung des Durchmessers der einzelnen Aggregate zu beobachten. Nach 2 Subkultivierungsschritten in Anwesenheit von PCE lag der maximale Durchmesser der Aggregate nur noch bei ungefähr 60 nm (Tab. 3-1).

**Tabelle 3-1:** Bestimmung der Größe der PceA-haltigen Proteinaggregate in Zellen von *D. hafniense* Y51 bei Kultivierung in Abwesenheit von PCE (LZK1; Subkultur 15) und anschließendem Transfer dieser Zellen auf PCE-haltiges Medium (Subkultur 1, 2).

Substrate	Subkultur	Anzahl der vermessenen PceA-Aggregate	Durchmesser der PceA-Aggregate (nm)	
			min	max
Pyruvat / Fumarat	15	22	67,9 $\pm$ 6,6	145,1 $\pm$ 13,2
Pyruvat / PCE	1	8	45,7 $\pm$ 4,5	107,2 $\pm$ 16,6
Pyruvat / PCE	2	10	45,7 $\pm$ 5,2	61,5 $\pm$ 4,6

#### *PceA-Aktivität*

Die Bestimmung der dechlorierenden Aktivität der gereinigten Protein-Aggregate war auf Grund des unvermeidbaren Sauerstoffeintrages während der Präparation nicht möglich. Der Eintrag von Sauerstoff im Laufe der Präparation hatte wegen der Sauerstoffempfindlichkeit von PceA einen Funktionsverlust der PCE-Dehalogenase zur Folge. Zur Untersuchung der PceA-Aktivität wurde deshalb auf die Membranfraktion von Zellen, die in Abwesenheit von PCE kultiviert wurden (LZK1, Subkultur 15), zurückgegriffen. Diese Membranfraktion enthielt einen Großteil der aggregierten PCE-Dehalogenase der Zellen. Als Kontrolle diente der lösliche Extrakt von Zellen, die in Anwesenheit von PCE kultiviert wurden, da unter diesen Bedingungen ein Großteil der PCE-Dehalogenase löslich im Exoplasma nachweisbar war (Reinhold 2008). Diese Fraktionen wurden, wie oben beschrieben, über eine subzelluläre Fraktionierung unter anaeroben Bedingungen gewonnen. Vergleich man die Aktivität beider subzellulärer Fraktionen, so wurde ersichtlich, dass die Membranfraktion lediglich 0,05% der PceA-Aktivität des löslichen Extraktes aufwies, was auf die Inaktivität von PceA in den Aggregaten hindeutet.

### *Vitamin B<sub>12</sub>-Gehalt*

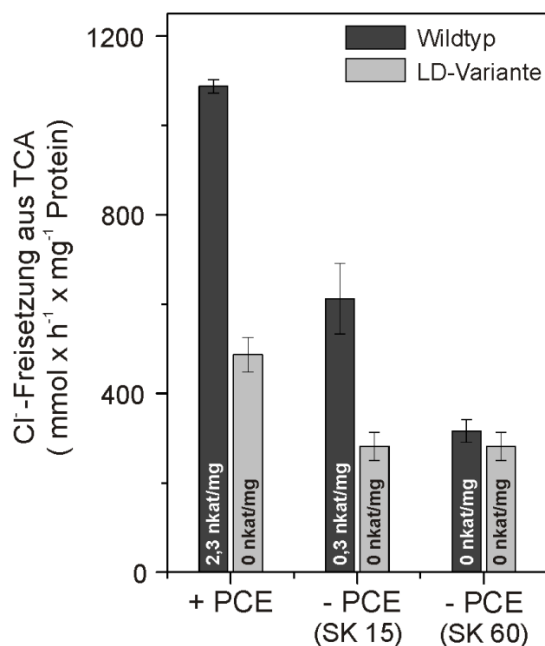
Untersuchungen zum Vitamin B<sub>12</sub>-Gehalt in *D. hafniense* Y51 nach 60 Subkulturen in Abwesenheit von PCE zeigten einen deutlichen Rückgang des Corrinoidegehaltes der Zellen gegenüber PCE-gewachsenen Zellen (LZK1, Reinhold 2008). Innerhalb dieser Subkultivierung wurde die Aggregation der PCE-Dehalogenase im Cytoplasma der Zellen beobachtet (Subkultur 15). Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen der Bildung der PceA-Aggregate und dem Rückgang des Corrinoidmenge der Zellen bestand.

Zur Bestimmung des Corrinoidegehaltes der PceA-Aggregate wurden die Subkultur 15 und die Subkultur 60 von *D. hafniense* Y51, kultiviert in Abwesenheit von PCE, verwendet (LZK1, Reinhold 2008). Die Bestimmung erfolgte über einen abiotischen Vitamin B<sub>12</sub>-Test, bei dem die Dehalogenierung von Trichloracetat (TCA) als Maß für die Menge an Corrinoid in den Zellen fungierte. Eine Untersuchung an den gereinigten Aggregaten war aufgrund der für den Test benötigten großen Menge an Aggregaten nicht möglich. Als Kontrolle wurde *D. hafniense* Y51 kultiviert in Anwesenheit von PCE verwendet. Neben der PCE-Dehalogenase gibt es in *D. hafniense* Y51 weitere Vitamin B<sub>12</sub>-abhängige Enzyme wie z. B. die Ribonukleotid-Reduktase. Zur Ermittlung der Corrinoidmenge, die für diese Enzyme benötigt wird, wurde ebenfalls die LD-Variante dieses Stammes untersucht. Diese Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass keine PCE-Dehalogenase gebildet werden kann, da der *pce*-Gencluster nicht vorhanden ist. Die Kultivierung beider Zelltypen in Anwesenheit von PCE zeigte, dass circa 50% der gesamten Corrinoidmenge der Zellen für die Bildung funktionsfähiger PCE-Dehalogenase verwendet wird (Abb. 3-9). Die Kultivierung des Wildtyps für 15 Subkulturen in Abwesenheit von PCE führte zu einem Rückgang der Corrinoidmenge, welche theoretisch für die PCE-Dehalogenase zur Verfügung steht, um circa 40%. Zu diesem Zeitpunkt lag ein Teil des PceA-Proteins der Zellen als inaktive Form in den Aggregaten vor, während auch noch katalytisch aktive PCE-Dehalogenase vorhanden war. Dies zeigte sich auch anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen und der um 50% geringeren gemessenen PceA-Aktivität der Zellen (Reinhold 2008, Abb. 3-9). Nach 60 Subkulturen in Abwesenheit von PCE konnte sogar eine Reduktion der für PceA zur Verfügung stehenden Corrinoidmenge um circa 90% beobachtet werden. Die gleichzeitig fehlende dechlorierende Aktivität dieser Subkultur (Abb. 3-9) und die Präsenz der Aggregate (Abb. 3-1 G) führte zu der Annahme, dass es sich bei dem PceA in den Aggregaten um eine inaktive, Corrinoid-Cofaktor freie Form handelt.

Die beobachtete Abnahme der Cl<sup>-</sup>-Freisetzung aus Trichloressigsäure (TCA) kann zwei Ursachen haben. Zum einen kann dies durch einen tatsächlichen Rückgang des



Corrinoidgehaltes der Zellen verursacht sein. Zum anderen kann auch eine Veränderung der Zusammensetzung der Corrinoiden der Zelle die Abnahme bedingen. Durch Neumann et al. (2002) konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Corrinoiden verschiedene Raten der Dehalogenierung von TCA aufweisen. Da sich Zusammensetzung der Corrinoiden in der untersuchten Subkultivierung nicht signifikant veränderte (Abb. 3-13 A-D), kann der Rückgang der  $\text{Cl}^-$ -Freisetzung auf einen sinkenden Corrinoidgehalt der Zellen zurückgeführt werden.



**Abbildung 3-9:** Corrinoidmenge im Wildtyp von *D. hafniense* Y51 und in der LD-Variante des Stammes während der Subkultivierung in An- oder Abwesenheit von PCE (mit Cyanocobalamin im Medium). Der Corrinoidgehalt der Zellen wurde mittels abiotischen Vitamin B<sub>12</sub>-Test anhand der  $\text{Cl}^-$ -Freisetzung aus Trichloracetat (TCA) ermittelt. In den Balken ist die PceA-Aktivität des jeweiligen Rohextraktes der Zellen angegeben. Die PceA-Aktivitäten wurden aus Reinhold (2008) entnommen.

### Zusammensetzung der Aggregate

Die Präsenz der PCE-Dehalogenase und des mutmaßlichen Faltungshelfers PceT in den Protein-Aggregaten ließen die Frage nach der Zusammensetzung dieser Aggregate entstehen. Für die Analyse wurden die gereinigten PceA-Aggregate (Fraktion: 86% (w/v) Saccharose) elektrophoretisch aufgetrennt und die sichtbaren Proteinbanden mittels LC-MS/MS analysiert (in Kooperation mit Dr. Jana Seifert und Dr. Martin von Bergen, Abteilung Proteomics, UFZ Leipzig). Als Kontrolle diente die gleiche Fraktion einer präparierten Kultur von *D. hafniense* Y51, die in Anwesenheit von PCE kultiviert wurde. In Tabelle 3-2 sind die Hauptkomponenten der Aggregate, sortiert nach ihrem Molekulargewicht, angegeben. Die vollständigen Daten der MS-Analyse sind dem Anhang der Arbeit zu entnehmen (Abb. A-1, Tab. A-1).

Durch Nachweis des Signalpeptids konnte die Vorläuferform der PCE-Dehalogenase (präPceA) eindeutig als Bestandteil der Aggregate identifiziert werden. Der Nachweis des

mutmaßlichen Chaperons PceT konnte nur anhand eines einzigen detektierten Peptides erfolgen. Zudem konnte ein „Score“, welcher den Grad der Übereinstimmung der gemessenen MS-Daten mit den Daten der verwendeten Datenbank beschreibt, nicht angegeben werden. Mögliche Ursachen könnten bei dem Verdau des Proteins mit Trypsin oder auch der Ionisierung der Peptide liegen. Beides würde dazu führen, dass ein Nachweis von PceT per LC-MS/MS nicht leicht möglich ist. Sowohl die elektronenmikroskopischen Untersuchungen (Abb. 3-3) als auch die immunologische Analyse der gereinigten Aggregatfraktion mit spezifischen Antikörpern gegen PceT belegen jedoch zweifelsfrei die Anwesenheit von PceT (Abb. 3-6) in den Aggregaten und unterstützen somit den Nachweis eines Peptids des Proteins über MS. Neben PceA und PceT wurden mehrere, an der Proteinbiosynthese beteiligte, Elongationsfaktoren sowie eine RNA-Polymerase nachgewiesen. Zudem konnte die Nikotinat-Nukleotid-Dimethylbenzimidazol-Phosphoribosyltransferase (CobT) detektiert werden, welche eine wichtige Rolle in der Corrino-Biosynthese bei der Bildung des unteren Liganden des Vitamin B<sub>12</sub> spielt. Proteine, für die weniger als 10 Peptide nachgewiesen werden konnten, wurden nicht zu den Hauptbestandteilen der Aggregate gezählt. Es ist dabei jedoch nicht auszuschließen, dass sie, wie auch PceT, dennoch in den Aggregaten vorkommen. Möglich ist auch, dass es sich bei diesen Proteinen um Präparationsartefakte handelt, zumal ein Teil der Proteine auch in der aggregatfreien Fraktion, der auf Pyruvat und PCE kultivierten Zellen nachweisbar waren.

**Tabelle 3-2:** Hauptbestandteile der PceA-Aggregate analysiert mittels LC-MS/MS und anschließender Analyse in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, September 2010). Angegeben sind die Proteinidentifikationsnummer (DSY), das Molekulargewicht, die Anzahl der gefundenen Peptide sowie der ermittelte Score-Wert und Abdeckungswert (Coverage).

Komponente	DSY	kDa	Anzahl der Peptide	Score	Abdeckung (%)
RNA-Polymerase, $\beta'$ -Untereinheit	0464	130	13	1161	10,1
Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase	0115	128	25	1176	19,8
RNA-Polymerase, $\beta$ -Untereinheit	0463	125	25	1115	23,1
Elongationsfaktor G	0468	76	19	390	27,0
Translations-Elongationsfaktor	1817	74	18	492	26,8
Tetrachlorethen-Dehalogenase	2839	61	25	434	33,2
Elongationsfaktor Tu	0469	44	16	0	33,8
CobT *	2114	39	14	526	24,2

\* Nikotinat-Nukleotid-Dimethylbenzimidazol-Phosphoribosyltransferase



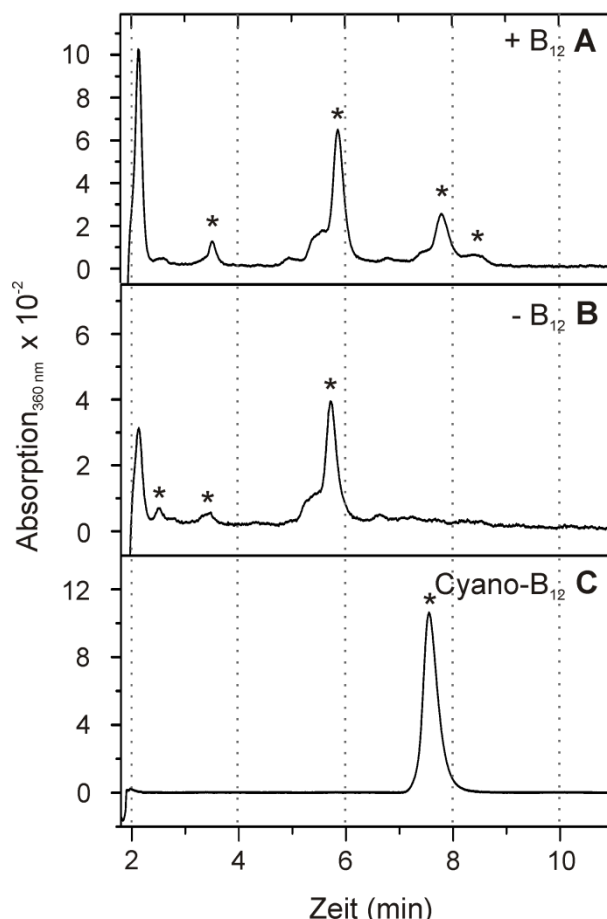
### 3.2 Untersuchung der Corrinoïd-Biosynthese in *D. hafniense* Y51

Die Aggregation der PCE-Dehalogenase in Abwesenheit von PCE und der damit verbundene Rückgang der Corrinoïdmenge, zeigte die Bedeutung des Corrinoïd-Cofaktors für die Bildung einer funktionellen der PCE-Dehalogenase. In dem folgenden Kapitel soll ein Einblick in die Corrinoïd-Biosynthese in *D. hafniense* Y51 und deren Beeinflussung durch äußere Faktoren gegeben werden. Eine Identifizierung des Cofaktors der PCE-Dehalogenase in *D. hafniense* Y51 war bis jetzt nicht erfolgreich. Für *D. hafniense* PCE-S wurde gezeigt, dass vermutlich mehrere strukturell verschiedene Corrinoïde als Cofaktoren der PCE-Dehalogenase fungieren können (Siebert 2002).

#### 3.2.1 Einfluss externer Corrinoïd-Quellen

Da in *D. hafniense* Y51 alle wichtigen Corrinoïd-Biosynthesegene vorhanden sind, wurde von einer *de novo* Biosynthese des Corrinoïd-Cofaktors der PCE-Dehalogenase ausgegangen (Abb. 1-4). Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Zellen von *D. hafniense* Y51 in Anwesenheit von PCE mit bzw. ohne externe Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle (Cyanocobalamin) im Medium kultiviert. Im letzteren Fall erfolgte die Kultivierung für mindestens 5 Subkulturen in Abwesenheit einer externen Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle, um eine Beeinflussung des Ergebnisses durch Reste an Vitamin B<sub>12</sub> im Medium auszuschließen. In Abbildung 3-10 sind die HPLC-Elutionsprofile der extrahierten Corrinoïde dargestellt.

Bei Kultivierung von *D. hafniense* Y51 mit externer Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle wurden im HPLC-Elutionsprofil insgesamt 4 Corrinoïdpeaks detektiert (Abb. 3-10 A). Diese besaßen ein charakteristisches Vitamin B<sub>12</sub>-Spektrum mit Absorptionsmaxima bei circa 360 nm und 530 nm (in 18% Methanol, 0,2% Essigsäure). Das Corrinoïd, welches nach 7,6 min eluierte, konnte anhand der Retentionszeit Cyanocobalamin (Vitamin B<sub>12</sub>, Abb. 3-10 C) zugeordnet werden. Die Abwesenheit dieses Corrinoïds in den Extrakten der Zellen, die ohne externe Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle kultiviert wurden, ließ eine Aufnahme von Cyanocobalamin in die Zelle vermuten. Ein mutmaßlicher Corrinoïd-Transporter ist im Gencluster *btuFCD* kodiert.



**Abbildung 3-10:** HPLC-Elutionsprofile der extrahierten Corrinoide aus *D. hafniense* Y51. Die Kultivierung erfolgte in Anwesenheit von PCE mit externer Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle (A, 30 nM Cyanocobalamin) bzw. ohne externe Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle (B) im Medium. (C) 100 µM Cyanocobalamin-Standard. Die dargestellten Profile entsprechen der Menge an Corrinoiden, die aus 1 g Protein der Zellen extrahiert wurden. \* - Peaks mit typischem Vitamin B<sub>12</sub>-Absorptionsspektrum. Cyano-B<sub>12</sub> – Cyanocobalamin.

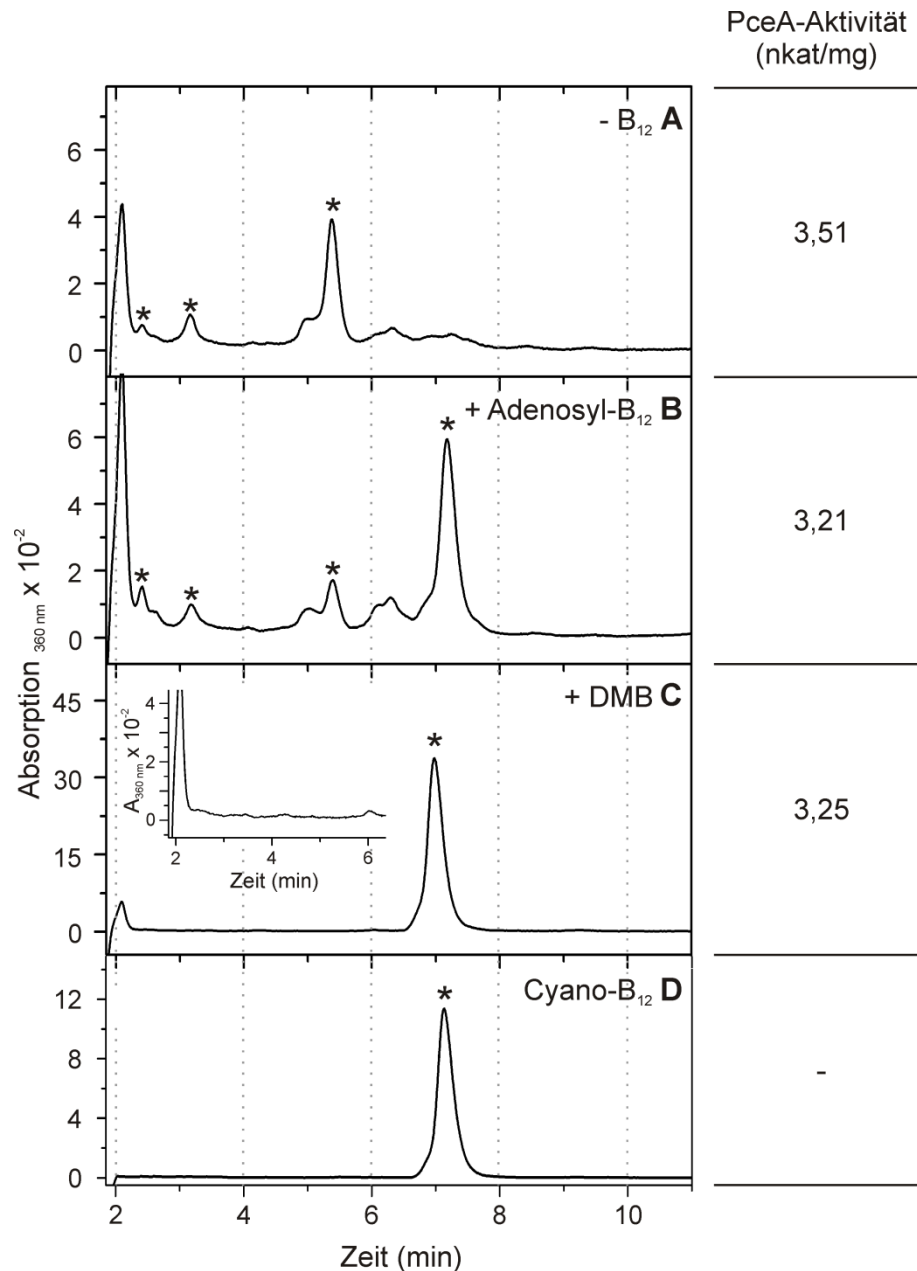
Das Corrinoide, welches bei ca. 5,8 min eluierte, wurde in Zellen, die mit bzw. ohne externen Vitamin B<sub>12</sub> im Medium kultiviert wurden, detektiert (Abb. 3-10 A, B). Die Präsenz dieses Corrinoids in Zellen ohne externe Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle zeigt, dass eine *de novo* Biosynthese der Corrinoide in *D. hafniense* Y51 möglich ist. Die ermittelte Retentionszeit des Corrinoids stimmt mit keinem der verwendeten Standards (siehe Material und Methoden) überein, sodass eine Strukturanalyse mittels LC-MS oder H<sup>1</sup>-NMR notwendig ist. Diese Analysen sollen in naher Zukunft in Kooperation mit Prof. Dr. Bernhard Kräutler (Institut für Organische Chemie, Universität Innsbruck, Österreich) erfolgen. Unter beiden Kultivierungsbedingungen lassen sich weitere Corrinoide, jedoch in deutlich geringeren Mengen nachweisen. Dabei könnte es sich ebenfalls um Corrinoide-Cofaktoren der PCE-Dehalogenase handeln. Es ist aber auch denkbar, dass es sich um Vorstufen in der Corrinoide-Biosynthese oder Abbauprodukte handelt.

### *Effekt von Adenosylcobalamin*

In allen bisherigen Untersuchungen zum Corrinoide-Cofaktor wurden die Zellen in Anwesenheit von externem Cyanocobalamin, das künstlich durch Extraktion von Corrinoiden mit Cyanid entsteht, kultiviert. Im folgenden Versuch wurde Cyanocobalamin durch das natürlich vorkommende Adenosylcobalamin (Adenosyl-B<sub>12</sub>) als externes Corrinoide ersetzt (Abb. 3-11 B).

Die Zugabe von Adenosylcobalamin führte zu einer veränderten Zusammensetzung der Corrinoiden in der Zelle. Der im HPLC-Elutionsprofil zuvor vorhandene Hauptpeak bei 5,3 min verschwand. Stattdessen tauchte ein neuer Hauptpeak bei 7,3 min auf (Abb. 3-11 A, B). Der Vergleich der Retentionszeiten lässt vermuten, dass es sich bei dem Peak bei 7,3 min um Cyanocobalamin handelt. Leichte Verschiebungen der Retentionszeiten lassen sich auf das verwendete HPLC-System zurückführen. Zudem hatte der Methanolgehalt des verwendeten Laufpuffers Einfluss auf die Retentionszeiten. Bereits kleine Änderungen der Methanolkonzentration bewirkten Verschiebungen der Retentionszeiten.

Bei der verwendeten Methode zur Extraktion von Corrinoiden mit Kaliumcyanid kommt es zum Austausch des oberen Liganden des Corrinoids gegen eine Cyanogruppe, sodass isoliertes Adenosylcobalamin in der Analyse als Cyanocobalamin nachweisbar ist. Demzufolge scheint eine Aufnahme von Adenosylcobalamin in die Zellen von *D. hafniense* Y51 zu erfolgen. Da Cyanocobalamin bzw. Adenosylcobalamin den Hauptpeak im HPLC-Elutionsprofil darstellt, könnte Adenosylcobalamin unter diesen Kultivierungsbedingungen als Cofaktor für die PCE-Dehalogenase fungieren. Diese Annahme wurde auch dadurch gestützt, dass es zu keiner Änderung der PceA-Aktivität kam.

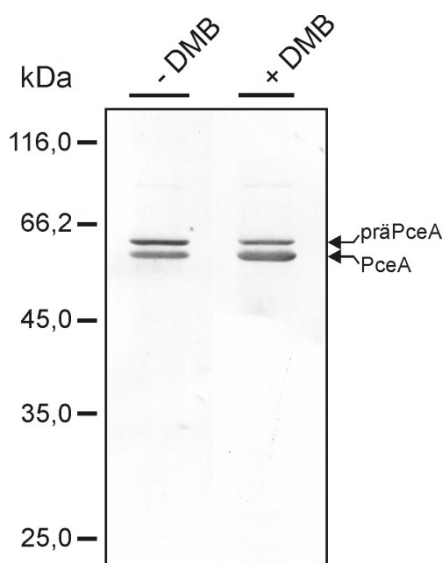


**Abbildung 3-11:** HPLC-Elutionsprofile der extrahierten Corrinoide aus *D. hafniense* Y51. Die Zellen wurden in Anwesenheit von PCE mit Adenosyl-B<sub>12</sub> bzw. 5,6-Dimethylbenzimidazol (DMB) kultiviert. Die Elutionsprofile entsprechen der Menge an Corrinoiden, die aus 1 g Protein der Zellen extrahiert wurden. Neben den Elutionsprofilen sind die PceA-Aktivitäten der Rohextrakte angegeben. Die Messungen wurden jeweils mit mindestens zwei Rohextrakten durchgeführt. (A) Kontrollversuch, ohne externe Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle. (B) Kultivierung mit Adenosyl-B<sub>12</sub> als externe Corrinoide-Quelle. (C) Zugabe von DMB ohne weitere externe Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle. (D) HPLC-Elutionsprofil von Cyanocobalamin (Cyano-B<sub>12</sub>). \* - Peaks mit charakteristischem Vitamin B<sub>12</sub>-Absorptionsspektrum.

*Effekt von Dimethylbenzimidazol*

Sowohl Cyanocobalamin als auch Adenosylcobalamin beinhalten als unteren Liganden am Corrinring 5,6-Dimethylbenzimidazol (DMB). Der Einfluss dieses Liganden auf die Corrinoid-Biosynthese in *D. hafniense* Y51 wurde getestet, indem bei Kultivierung in Anwesenheit von PCE dem Medium 10  $\mu$ M DMB ohne externe Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle zugesetzt wurde. Unter diesen Bedingungen konnte die 4 - 5 fache Menge an Corrinoiden isoliert werden. Das HPLC-Elutionsprofil der isolierten Corrinoiden (Abb. 3-11 C) zeigte zudem, dass wie im Falle der Zugabe von Adenosylcobalamin der Hauptpeak bei 5,3 min verschwindet und ein neuer Peak bei 7,1 min auftaucht. Eine Bildung weiterer Corrinoiden oder von Biosynthese-Vorstufen konnte nicht beobachtet werden (Abb. 3-11 C, eingefügter Graph). Auf Grund der hohen Ausbeute isolierter Corrinoiden war es möglich, den Extrakt zur Identifizierung des Vitamin B<sub>12</sub>-Derivats für eine LC-MS-Analyse zu verwenden (in Kooperation mit Prof. Dr. Bernhard Kräutler, Institut für Organische Chemie, Universität Innsbruck, Österreich). Anhand dieser Analysen konnte das isolierte Corrinoid eindeutig als Cyanocobalamin identifiziert werden, was bereits auf Grund der übereinstimmenden Retentionszeiten mit dem Standard (Abb. 3-11 D) vermutet wurde.

Obwohl eine signifikante Erhöhung der Corrinoidmenge in den Zellen verzeichnet wurde, erfolgte keine Steigerung der PceA-Aktivität (Abb. 3-11 C). Offensichtlich wird durch DMB zwar die Corrinoid-Biosynthese gesteigert, was zu einem Überschuss an Corrinoiden in den Zellen führte, dies hat aber keinen Einfluss auf die Synthese aktiver PCE-Dehalogenase (Abb. 3-12). Die gesteigerte Prozessierung von präPceA deutet auf eine erhöhte Translokation des Enzyms über die Cytoplasmamembran hin, was möglicherweise auf die bessere Versorgung mit Corrinoid-Cofaktor zurückzuführen ist (Abb. 3-12).



**Abbildung 3-12:** Immunoblot zum Nachweis von PceA in Rohextrakten von *D. hafniense* Y51. Die Zellen wurden in Anwesenheit von PCE mit und ohne 10  $\mu$ M 5,6-Dimethylbenzimidazol (DMB) im Medium kultiviert. Pro Spur wurden 5  $\mu$ g Gesamtprotein aufgetragen. *präPceA* - Vorläuferform von PceA. *PceA* - gereifte Form von PceA.

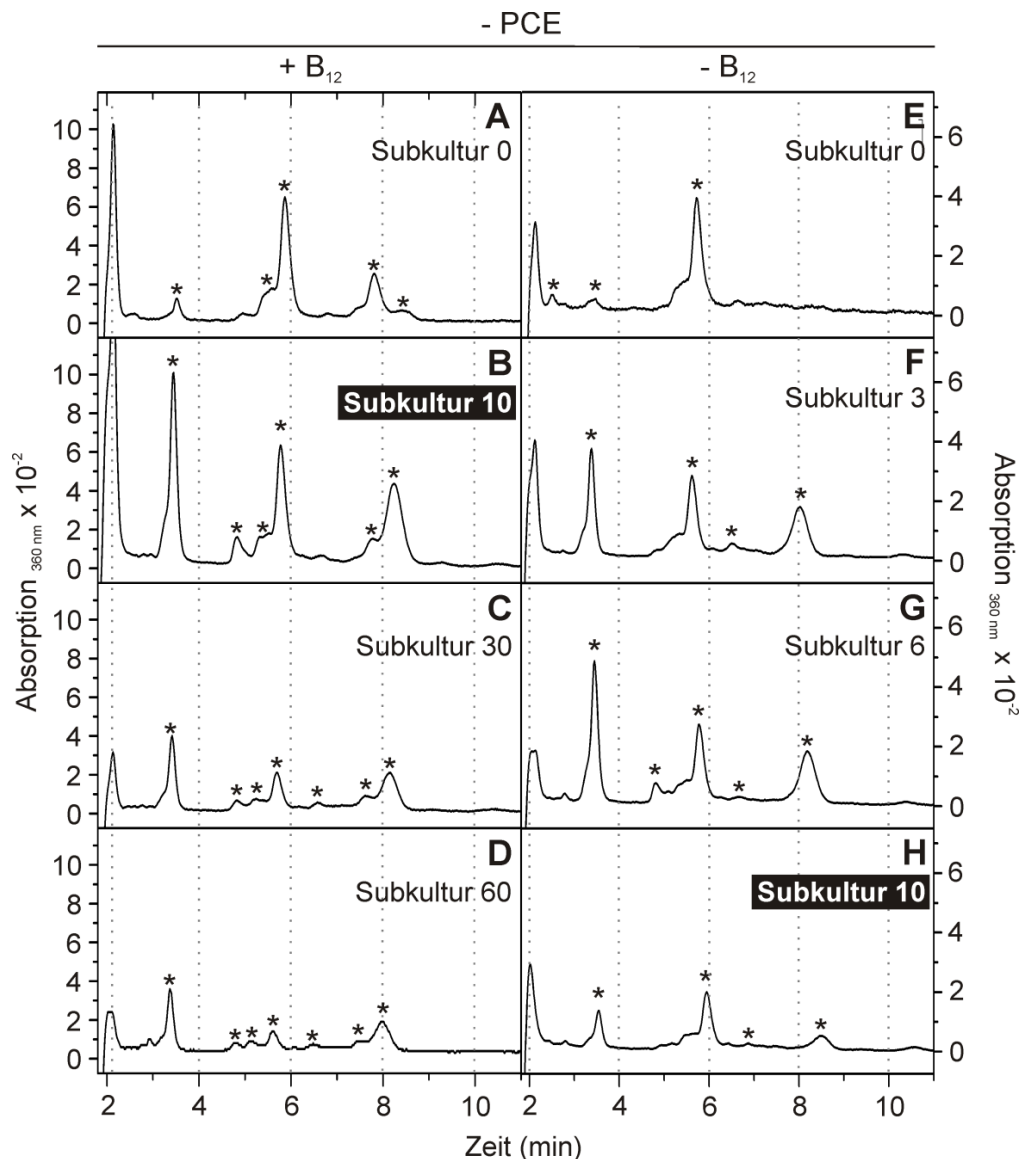
### 3.2.2 Einfluss von Tetrachlorethen

Dass die Anwesenheit bzw. Abwesenheit von PCE einen Einfluss auf die Bildung und Funktion der PCE-Dehalogenase hat, ist bekannt (Reinhold 2008, Reinhold et al. 2012). Auch die Abnahme des Corrinoidgehaltes der Zellen bei Kultivierung in Abwesenheit von Tetrachlorethen konnte gezeigt werden (Reinhold 2008, Reinhold et al. 2012). Bisher noch nicht untersucht, war der Einfluss von Tetrachlorethen auf die Corrinoide-Zusammensetzung in den Zellen. Dazu wurde auf die bereits beschriebene Langzeitkultivierung von *D. hafniense* Y51 in Abwesenheit von PCE (mit externer Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle), mit kontinuierlicher Bildung des PceA-Proteins und Verlust der dechlorierenden Aktivität nach 30 Subkulturen zurückgegriffen (LZK1, Reinhold 2008). Der beschriebene Rückgang der Corrinoide im Laufe dieser Kultivierung wurde hier ebenfalls anhand der HPLC-Elutionsprofile beobachtet, wobei es nach Subkultur 30 zur keiner weiteren signifikanten Änderung der Corrinoide kam (Abb. 3-13). Hervorzuheben ist, dass es innerhalb der ersten 10 Subkulturen zu einer Veränderung in der Zusammensetzung der Corrinoide der Zelle kam (Abb. 3-13 A, B). Das dominante Corrinoide bei Kultivierung in Anwesenheit von PCE (Abb. 3-13 A; Peak: 5,9 min) wurde bei Kultivierung in Abwesenheit von PCE durch zwei weitere Corrinoide mit Peaks bei ca. 3,5 min und ca. 8,2 min ergänzt (Abb. 3-13 B). Beide Corrinoide waren bereits bei Subkultur 0 nachweisbar, jedoch in wesentlich geringeren Mengen. Zudem war ein weiterer kleinerer Peak bei ca. 4,9 min zu erkennen. Im weiteren Verlauf der Kultivierung konnte keine weitere Änderung der Zusammensetzung, sondern nur eine Reduktion der Corrinoide beobachtet werden. Neben den drei Hauptpeaks fand man in allen drei getesteten Subkulturen weitere kleinere Peaks. Dabei könnte es sich um weitere Vitamin B<sub>12</sub>-Derivate oder um Vorstufen der Corrinoide-Biosynthese handeln. Die Retentionszeiten der Peaks stimmen nicht mit denen der getesteten Corrinoide-Standards (siehe Material und Methoden) überein. Die exakte Identifizierung der Corrinoide ist nur mittels LC-MS-Analyse möglich, welche auf Grund der geringen Corrinoidekonzentrationen bisher noch nicht durchführbar war.

In einer weiteren Kultivierungsreihe wurde der Einfluss von PCE auf die Zusammensetzung der Corrinoide in Abwesenheit einer externen Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle untersucht (Abb. 3-13 E -H). Diese Kultivierung zeichnete sich durch einen kompletten Verlust des PceA-Apoproteins und der dechlorierenden Aktivität nach ungefähr 6 Subkulturen aus (siehe Kapitel 3.3, Reinhold et al. 2012). Ein signifikanter Rückgang der Corrinoide konnte erst bei Subkultur 10 beobachtet werden (Abb. 3-13 H), obwohl bereits bei Subkultur 6 keine PCE-Dehalogenase mehr nachweisbar war. Folglich kann der

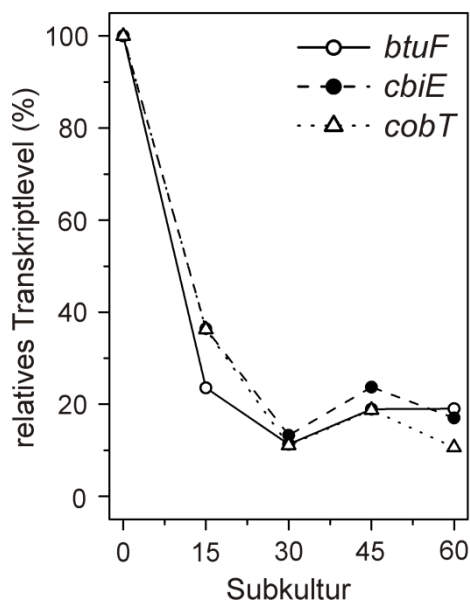
Mangel an Corrinoïd-Cofaktor in diesem Fall nicht der Grund für den kompletten Aktivitätsverlust sein.

Die Zusammensetzung der Corrinoide unterschied sich nicht signifikant von der Corrinoïdkomposition bei Kultivierung mit externer Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle. Unterschiede bestanden jedoch in Bezug auf die Corrinoïdmenge in den Zellen nach 10 Subkulturen. Während bei der Kultivierung mit externer Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle innerhalb der ersten 10 Subkulturen offensichtlich keine signifikante Änderung der Corrinoïdmenge eintrat (Abb. 3-13 A, B), so ist bei Kultivierung ohne externes Vitamin B<sub>12</sub> bereits ein Rückgang der Corrinoïdmenge zu erkennen (Abb. 3-13 E-H).



**Abbildung 3-13:** HPLC-Elutionsprofile extrahierter Corrinoide bei Subkultivierung von *D. hafniense* Y51 in Abwesenheit von PCE. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Cyanocobalamin als externer Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle (A-D) bzw. ohne externe Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle (E-H) kultiviert. Die dargestellten Profile entsprechen der Menge an Corrinoïden, die aus 1 g Protein der Zellen extrahiert wurde. \* - Peaks mit charakteristischem Vitamin B<sub>12</sub>-Absorptionsspektrum.

Die bisherigen Ergebnisse deuten auf einen Einfluss von PCE auf die Corrinoïd-Biosynthese hin. Zur Untersuchung dieser Hypothese auf molekularbiologischer Ebene wurde das Transkriptlevel von Genen, welche für Enzyme der Corrinoïd-Biosynthese kodieren, untersucht. In *D. hafniense* Y51 sind die kodierenden Gene über mehrere Gencluster verteilt (Abb. 1-4). Deshalb wurde aus jedem Gencluster jeweils die Expression nur eines Genes untersucht. Es handelte sich jeweils um die am 5'-Ende des Clusters befindlichen Gene (*btuF*, *cbiE*, *cobT*). In Abbildung 3-14 ist die Abnahme der Transkriptlevel der Gene bei Kultivierung von *D. hafniense* Y51 in Abwesenheit von PCE mit externer Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle dargestellt. Innerhalb der ersten 30 Subkulturen kam es zu einem kontinuierlichen Abfall der mRNA-Menge bis auf ca. 30%. Innerhalb dieses Zeitraums konnte auch der Rückgang der Corrinoïdmenge in den Zellen (Abb. 3-13 A-D) sowie der Verlust der PceA-Aktivität beobachtet werden (Reinhold 2008). Bis zum Ende des Kultivierungszeitraumes blieb das Transkriptlevel auf diesem konstant niedrigen Niveau. Eine Änderung des Corrinoïdgehaltes der Zellen konnte ebenfalls nicht beobachtet werden (Abb. 3-13 C, D). Die vorläufigen Daten der Kultivierung von *D. hafniense* Y51 ohne externes Vitamin B<sub>12</sub> zeigten innerhalb der ersten 10 Subkulturen keinen signifikanten Rückgang der mRNA-Menge der Gene (Daten nicht gezeigt). Auch eine Reduktion der Corrinoïdmenge der Zellen konnte nicht beobachtet werden (Abb. 3-13 E-H).



**Abbildung 3-14:** Abnahme des Transkriptlevels der Gene *btuF*, *cbiE* und *cobT* in *D. hafniense* Y51 bei Subkultivierung in Abwesenheit von PCE mit Cyanocobalamin als externer Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle.



### 3.3 Einfluss exogener Faktoren auf die PCE-Dehalogenase

#### 3.3.1 Vitamin B<sub>12</sub>

Im vorangehenden Kapitel wurde gezeigt, dass die Art des extern vorhandenen Vitamin B<sub>12</sub>-Derivats die Zusammensetzung der Corrinoide der Zellen beeinflusst. Im folgenden Kapitel wird auf den Einfluss von externem Vitamin B<sub>12</sub> (Cyanocobalamin) auf die Synthese, subzelluläre Lokalisation und die Funktionalität der PCE-Dehalogenase eingegangen.

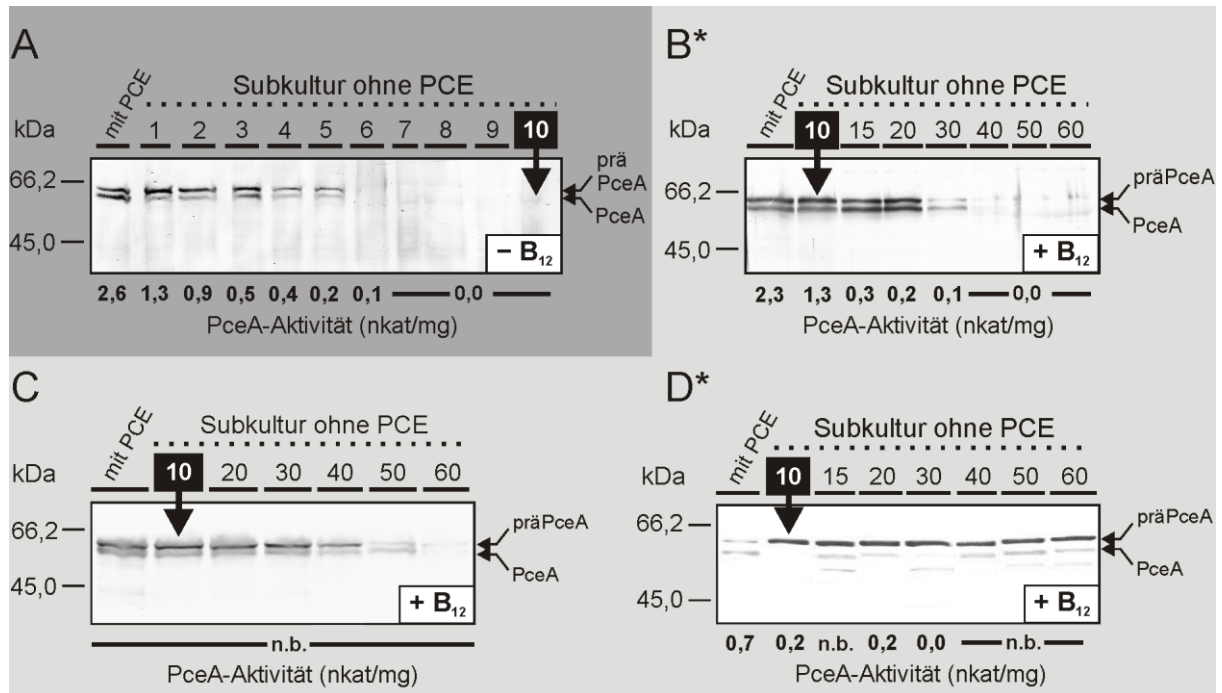
##### 3.3.1.1 Synthese und Lokalisation der PCE-Dehalogenase

Zur Beurteilung des Effekts von Vitamin B<sub>12</sub> auf die Synthese der PCE-Dehalogenase wurden Subkultivierungsversuche in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von PCE bzw. von externem Vitamin B<sub>12</sub> (Cyanocobalamin) durchgeführt. In Anwesenheit von PCE hatte die Verfügbarkeit einer externen Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle keinen Einfluss auf die Bildung und Aktivität der PCE-Dehalogenase. Unter diesen Bedingungen kam es zu einer kontinuierlichen Bildung von funktionsfähigem Enzym (Daten nicht gezeigt).

Bei Kultivierung von *D. hafniense* Y51 in Abwesenheit von PCE und externer Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle bestehen 2 Möglichkeiten: Entweder es kommt zu einer kontinuierlichen Bildung inaktivem PceA-Proteins (Abb. 3-15 D; Reinhold 2008) oder es tritt ein Verlust von PceA-Aktivität und PceA-Protein auf (Abb. 3-15 B, C; Reinhold 2008). Im letzteren Fall wurde der Verlust des PceA-Proteins meist nach 30 Subkulturen beobachtet (Abb. 3-15 B). Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass der vollständige Verlust des PceA-Proteins erst nach 60 Subkulturen eintritt (Abb. 3-15 C). Unabhängig davon, ob es zu einer kontinuierlichen Bildung oder zu einem Verlust der PCE-Dehalogenase kam, konnte nach 30 - 35 Subkulturen keine dechlorierende Aktivität mehr nachgewiesen werden. Dieser Aktivitätsverlust ging einher mit dem Rückgang des Corrinoidgehaltes der Zellen (Abb. 3-13; Reinhold 2008). Bei konstanter Bildung der PCE-Dehalogenase bzw. Verlust von PceA nach 60 Subkulturen wurde nach diesem Zeitpunkt nur noch Cofaktor-freies inaktives PceA-Protein gebildet.

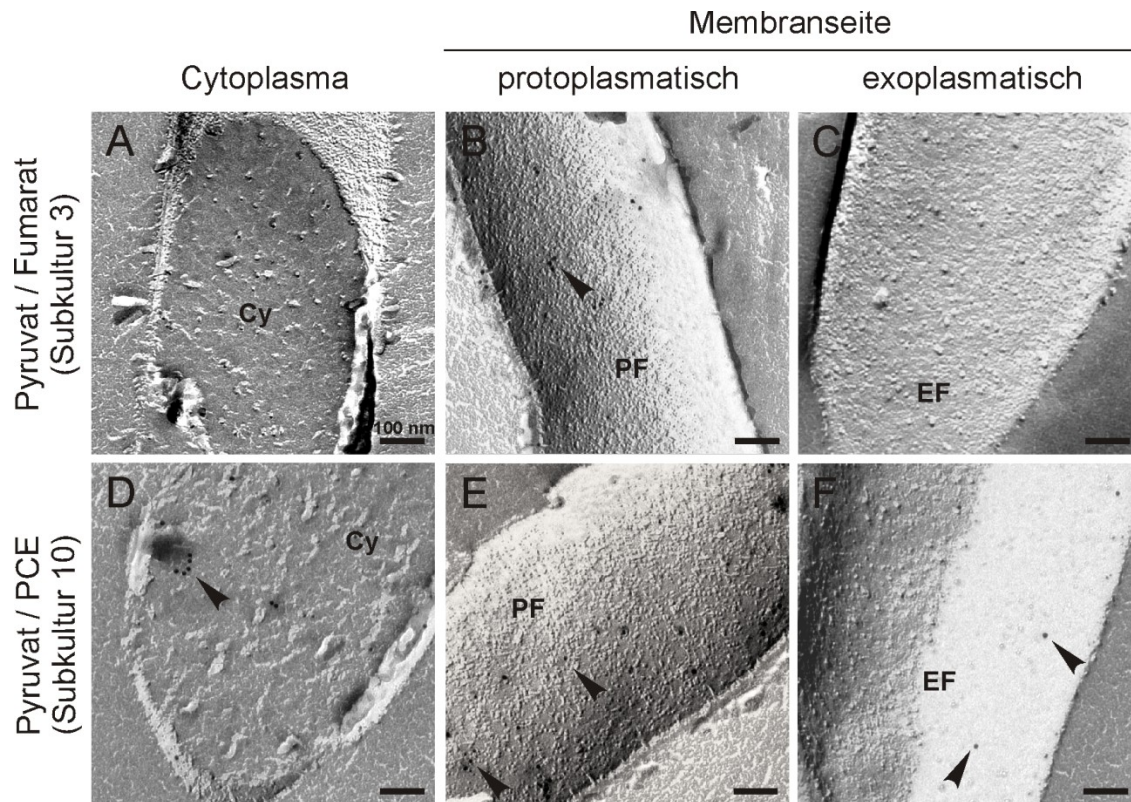
Der Einfluss von Vitamin B<sub>12</sub> auf die Synthese der PCE-Dehalogenase zeigte sich bei Kultivierung von *D. hafniense* Y51 ohne externe Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle und PCE im Medium (Abb. 3-15 A). Hier trat der vollständige Verlust des PceA-Proteins bereits nach 6 Subkulturen auf und damit deutlich schneller als bei Verfügbarkeit von externem Vitamin B<sub>12</sub>. Die dechlorierende Aktivität war bereits nach einer Subkultur um 50% reduziert (Abb. 3-15 A). Bei Kultivierung in Anwesenheit von externen Vitamin B<sub>12</sub> war dies erst nach 10

Subkulturen der Fall (Abb. 3-15 B). Der vollständige Verlust der PceA-Aktivität trat zeitgleich mit dem Verlust des PceA-Proteins nach 6 Subkulturen ein. Innerhalb dieses Zeitraumes konnte kein signifikanter Rückgang des Corrinoidgehaltes der Zellen beobachtet werden, sodass der Mangel an Corrinoide-Cofaktor beim Rückgang der dechlorierenden Aktivität keine Rolle spielen sollte (Abb. 3-13).



**Abbildung 3-15:** Bildung von PceA während der Subkultivierung von *D. hafniense* Y51 in Abwesenheit von Tetrachlorethen (PCE). Die Kultivierung erfolgte ohne (A) bzw. mit (B, C, D) externer Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle (30 nM Cyanocobalamin) im Medium. Dargestellt sind Immunoblots in denen PceA mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen wurde. Pro Spur wurden 5 µg Gesamtprotein aufgetragen. Angegeben ist zudem die gemessene Aktivität der PCE-Dehalogenase (PceA). präPceA - Vorläuferform von PceA, PceA - gereiftes PceA-Protein. \* Daten aus Reinhold (2008). n.b. - nicht bestimmt.

Die Kultivierung von *D. hafniense* Y51 in Abwesenheit von PCE mit externer Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle führte zur Aggregation der PCE-Dehalogenase im Cytoplasma der Zellen (Abb. 3-1, Reinhold 2008). Die Aggregation der PCE-Dehalogenase konnte auch bei Kultivierung ohne externes Vitamin B<sub>12</sub> im Medium beobachtet werden, jedoch in Anwesenheit von PCE (Abb. 3-16). Zellen, die in Abwesenheit von PCE kultiviert wurden, beinhielten hingegen kaum PceA-Protein und deshalb keine Aggregate. Die Untersuchung der subzellulären Lokalisation erfolgte an Zellen, die 3 Subkulturen in Abwesenheit von PCE kultiviert wurden, um einen Einfluss von Tetrachlorethen aus der Vorkultur auszuschließen. Jedoch führte dies zu einem starken Rückgang des PceA-Proteins (Abb. 3-15 A), sodass die Gesamtmenge der nachweisbaren PceA-Proteine in den Replikas stark reduziert war.



**Abbildung 3-16:** Nachweis von PceA in Zellen von *D. hafniense* Y51 per Immungold-Markierung (FRIL). Die Kultivierung erfolgte für 3 Subkulturen in Abwesenheit von PCE (**A-C**) bzw. für 10 Subkulturen in Anwesenheit von PCE (**D-F**). Dem Medium wurde kein externes Vitamin B<sub>12</sub> zugesetzt. Die Abbildungen zeigen Gefrierbrüche durch das Cytoplasma (Cy), die protoplasmatische Bruchfläche (PF) und die exoplasmatische Bruchfläche (EF) der Cytoplasmamembran. Die Skalen in den Teilabbildungen entsprechen jeweils 100 nm.

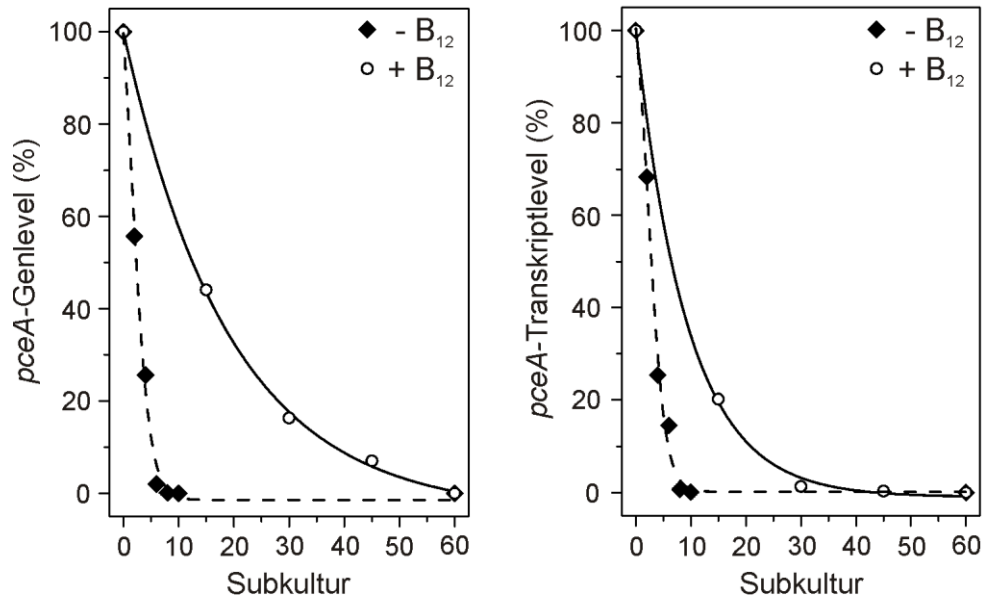
Eine mögliche Erklärung für die Aggregation von PceA in Zellen von *D. hafniense* Y51 in Anwesenheit von PCE könnte ein Mangel an Corrinoide-Cofaktor sein. Für eine Corrinoide-Limitierung spricht, dass Zellen, die ohne zugegebenes Vitamin B<sub>12</sub> kultiviert wurden, einen geringeren Gehalt an Corrinoiden aufwiesen als Zellen, die mit externem Vitamin B<sub>12</sub> gewachsen waren (Abb. 3-11). Bei angenommen gleicher Expressionsrate der *pce*-Gene und Bildung von PceA wird ohne externe Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle im Medium möglicherweise mehr PCE-Dehalogenase gebildet, als Corrinoide-Cofaktor zur Verfügung steht. Der Überschuss Cofaktor-freier PCE-Dehalogenase würde die Aggregation von PceA im Cytoplasma der Zellen erklären (siehe Kapitel 3.1, Reinhold 2008, Reinhold et al. 2012). Neben den Proteinaggregaten findet man jedoch auch freie PceA-Proteine auf der protoplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran (Abb. 3-16 E) und vereinzelt auch auf der exoplasmatischen Seite (Abb. 3-16 F). Die Signaldichte war unter den gewählten Bedingungen jedoch sehr gering, weshalb eine Bestimmung der Signale/ $\mu\text{m}^2$  nicht sinnvoll war.

### 3.3.1.2 Stabilität und Expression des *pce*-Genclusters

In Abwesenheit von PCE wurde der Rückgang der PceA-Aktivität und der Verlust des PceA-Proteins unabhängig von der Verfügbarkeit einer externen Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle im Medium beobachtet (Kapitel 3.3.1.1, Reinhold 2008, Reinhold et al. 2012). Im Folgenden sollte auf molekularbiologischer Ebene die Ursache des Rückgangs an PceA untersucht werden. Dafür wurde sowohl das *pceA*-Gen- als auch das *pceA*-Transkriptlevel der Zellen von *D. hafniense* Y51 während der Subkultivierung in Abwesenheit von PCE mit bzw. ohne externes Vitamin B<sub>12</sub> bestimmt. Während der Subkultivierung wurden in regelmäßigen Abständen Proben zur Isolierung von DNA und RNA entnommen. Die Probenahme erfolgte stets in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer optischen Dichte bei 578 nm von ~ 0,4. Die Quantifizierung des Gen- bzw. Transkriptlevels erfolgte anschließend mittels quantitativer PCR. Neben dem Zielgen *pceA* wurde ebenfalls die Expression von *rpoB*, welches die  $\beta$ -Untereinheit der RNA-Polymerase kodiert, untersucht. Dieses Gen wurde in der Literatur bereits mehrfach als Referenzgen für quantitative Analysen in *Desulfitobacterium hafniense* validiert und verwendet (Peng et al. 2012; Duret et al. 2012). Auch in den durchgeführten Untersuchungen war das Transkriptlevel von *rpoB* innerhalb der Subkultivierung von Subkultur zu Subkultur konstant, sodass es sich als Referenzgen für die quantitativen Analysen anbot.

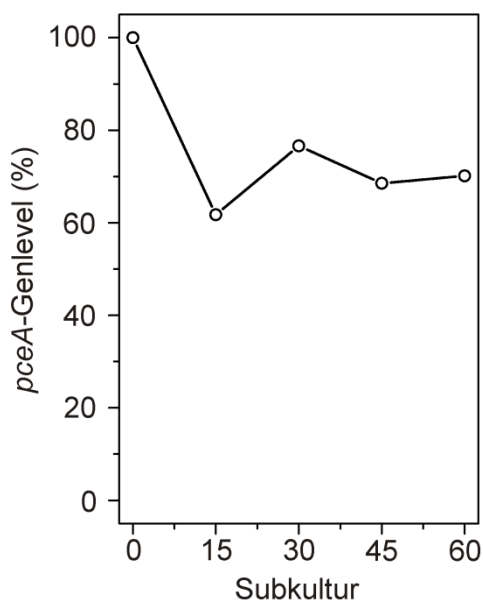
Bei Kultivierung von *D. hafniense* Y51 in Abwesenheit von PCE und ohne externes Vitamin B<sub>12</sub> im Medium war ein schneller Rückgang des *pceA*-Gen- und *pceA*-Transkriptlevels zu beobachten. So enthielten nach circa 2 Subkulturen nur noch etwa 50% der Zellen ein *pceA*-Gen (Abb. 3-17 A). Diese Angabe beruht auf der Tatsache, dass pro Zelle von *D. hafniense* Y51 nur ein *pce*-Gencluster vorhanden ist. Die Reduktion der *pceA*-Genzahl deutet auf die Exzision des *pce*-Genclusters aus dem Genom hin. Dieser Befund wird durch den ebenfalls sinkenden *pceT*-Genlevel in diesen Kulturen unterstützt (Daten nicht gezeigt). Der *pceA*-Transkriptlevel lag zu diesem Zeitpunkt bei etwa 70% (Abb. 3-17 B). Weder Gen noch Transkript waren nach ungefähr 8 Subkulturen (~ 28 Generationen) nachweisbar.

Bei Kultivierung in Anwesenheit von externem Vitamin B<sub>12</sub> war der Verlust des *pceA*-Gens deutlich verzögert (Abb. 3-17 A). Nach circa 15 Subkulturen in Abwesenheit von PCE wiesen immer noch fast 50% der Zellen der Kultur ein *pceA*-Gen auf. Der *pceA*-Transkriptlevel war bereits deutlich reduziert und lag bei circa 20% des Ausgangswertes (Abb. 3-17 B). In diesen Kulturen von *D. hafniense* Y51 trat ein kompletter Verlust des *pceA*-Gens nach etwa 60 Subkulturen auf. Das Transkript konnte wie das PceA-Protein (Abb. 3-15 B) bereits nach etwa 30 Subkulturen nicht mehr nachgewiesen werden.



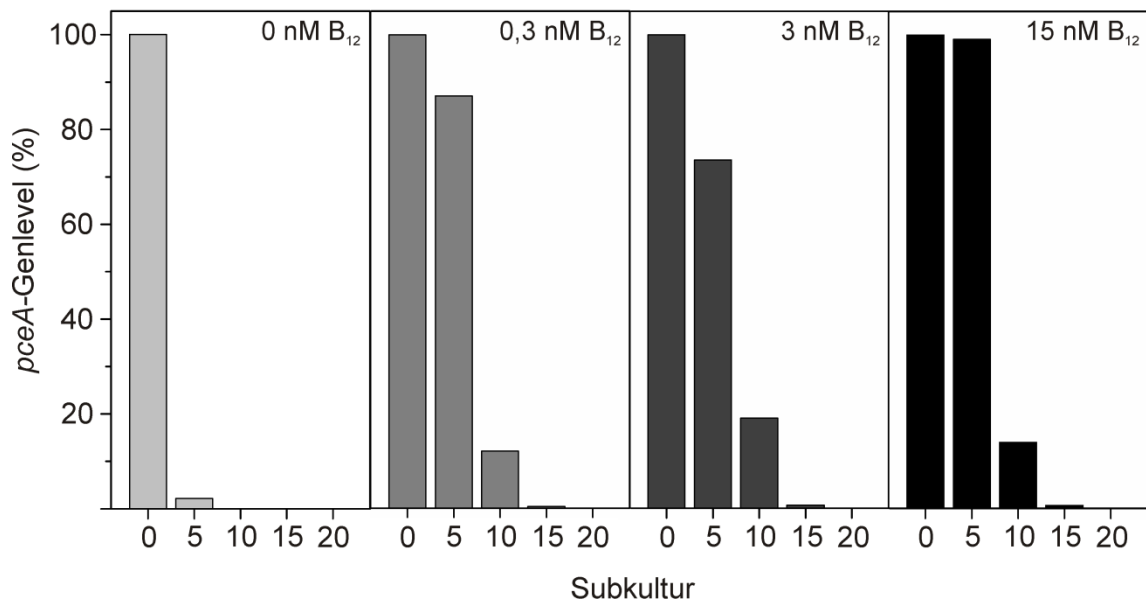
**Abbildung 3-17:** Relative *pceA*-Genlevel (A) und *pceA*-Transkriptlevel (B) in Kulturen von *D. hafniense* Y51. Die Zellen wurden in Abwesenheit von PCE mit externem Vitamin B<sub>12</sub> (+B<sub>12</sub>; 50 µg/l Cyanocobalamin) oder ohne externes Vitamin B<sub>12</sub> (-B<sub>12</sub>) im Medium kultiviert.

Wie bereits beschrieben, kann es bei der Kultivierung von *D. hafniense* Y51 in Abwesenheit von PCE mit externem Vitamin B<sub>12</sub> auch zu einer kontinuierlichen Bildung des PceA-Proteins kommen (Abb. 3-15 D). Auch unter diesen Bedingungen konnte ein Rückgang der *pceA*-Menge in den Kulturen beobachtet werden, jedoch blieb der Wert nach circa 30 Subkulturen konstant bei circa 70% (Abb. 3-18).



**Abbildung 3-18:** Relativer *pceA*-Genlevel in *D. hafniense* Y51 bei Kultivierung in Abwesenheit von PCE mit externer Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle (50 µg/l Cyanocobalamin) im Medium. Die Kultivierung zeichnete sich durch eine nahezu konstante Bildung von PceA aus (Abb. 3-15 D).

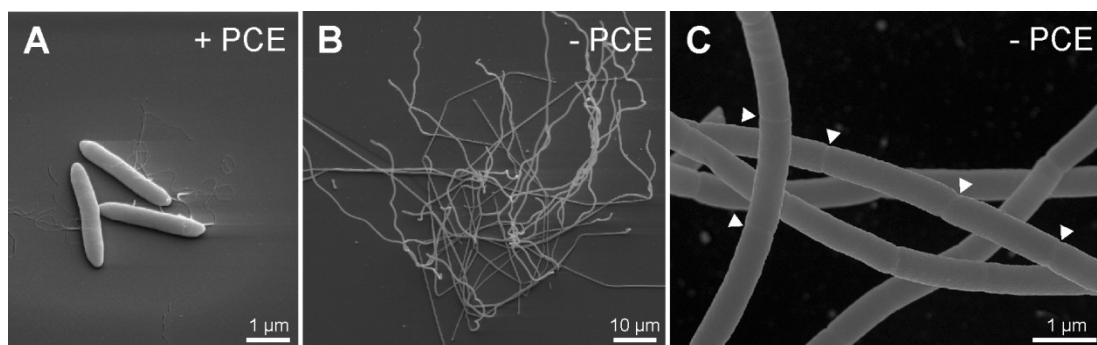
Die erhaltenen Daten zeigten, dass externes Vitamin B<sub>12</sub> die Stabilität des *pce*-Genclusters im Genom von *D. hafniense* Y51 erhöht. Ob es sich dabei um einen dosisabhängigen Effekt handelt, wurde im Folgenden untersucht. Es erfolgte eine Kultivierung von *D. hafniense* Y51 wiederum in Abwesenheit von PCE. Zum Test der Dosisabhängigkeit wurden dem Medium unterschiedliche Mengen an Cyanocobalamin (0,3 nM = 0,5 µg/l; 3 nM = 5 µg/l; 15 nM = 25 µg/l) zugegeben. Nach jeweils 5 Subkulturen wurde der *pceA*-Genlevel bestimmt (Abb. 3-19).



**Abbildung 3-19:** Relativer *pceA*-Genlevel in Kulturen von *D. hafniense* Y51 bei Subkultivierung in Abwesenheit von PCE. Die Kultivierung erfolgte mit unterschiedlicher Menge an extern zugesetztem Vitamin B<sub>12</sub> im Medium. Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten aus 2 Experimenten.

Bereits 1% der normalerweise verwendeten Vitamin B<sub>12</sub>-Menge im Medium (30 nM; 50 µg/l) bewirkte eine signifikante Verzögerung des Verlustes des *pceA*-Gens (Abb. 3-19, 2. Spalte). Dieser Effekte konnte durch Erhöhung der Konzentration an externem Vitamin B<sub>12</sub> geringfügig gesteigert werden (Abb. 3-19, Spalte 3 und 4). Bei allen verwendeten Vitamin B<sub>12</sub>-Konzentrationen trat ein kompletter Verlust des *pce*-Genclusters nach 20 Subkulturen ein. Eine weitere Erhöhung des externen Vitamin B<sub>12</sub>-Gehaltes führte zu einer weiteren Verzögerung der Exzision des *pce*-Genclusters (Abb. 3-17 A).

Neben dem Einfluss von externem Vitamin B<sub>12</sub> auf die Corrinoïd-Biosynthese (Kapitel 3.2) und auf die Stabilität des *pce*-Genclusters (siehe oben) scheint eine gleichzeitige Abwesenheit von PCE und externem Vitamin B<sub>12</sub> Auswirkungen auf die Zellmorphologie zu haben. In Anwesenheit von PCE unabhängig von der Verfügbarkeit einer externen Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle wurde die typische begeißelte Stäbchenform ausgebildet (Abb. 3-20 A). Gleiches wurde bei Kultivierung ohne PCE aber mit externem Vitamin B<sub>12</sub> beobachtet. Die anhaltende Abwesenheit von PCE und externem Vitamin B<sub>12</sub> führte hingegen zur Ausbildung eines filamentösen Phänotyps (Abb. 3-20 B). Dabei handelt es sich um nicht vollständig getrennte Zellen von *D. hafniense* Y51. Dies ist an der Segmentierung des Zellfadens (Abb. 3-20 C, Pfeile) zu erkennen. Eine Schleimhülle konnte nicht nachgewiesen werden. Die Ursache dieser morphologischen Veränderung ist unbekannt. Der Einfluss dieser phänotypischen Besonderheit auf die durchgeführten Experimente ist gering, da alle Experimente und Analysen jeweils mit definierten Mengen an Protein, DNA bzw. RNA erfolgten und nicht auf Grundlage einer definierten Zellmenge.



**Abbildung 3-20:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *D. hafniense* Y51 in Anwesenheit (A) bzw. Abwesenheit von PCE (B, C). Die Kultivierung erfolgte ohne externe Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle im Medium. Die Pfeile markieren die Zellgrenzen zweier aufeinanderfolgender Zellen.

### 3.3.2 Tetrachlorethen

Die Anwesenheit von Tetrachlorethen (PCE) führte zur kontinuierlichen Bildung aktiver PCE-Dehalogenase. Die Abwesenheit von PCE führte hingegen häufig zu einem Verlust von PceA-Protein und PceA-Aktivität (Reinhold 2008). Im direkten Zusammenhang mit der Verfügbarkeit von externem Vitamin B<sub>12</sub> scheint der Rückgang des PceA-Proteins auf dem Verlust des *pce*-Genclusters zu beruhen. Durch die Transposition des Genclusters in Abwesenheit von PCE entstehen in den Kulturen von *D. hafniense* Y51 im Laufe der Subkultivierung immer mehr nicht-dechlorierende Varianten des Stammes.



### 3.3.2.1 Isolierung konstant dechlorierender Varianten

Für die Untersuchung der Regulation der reduktiven Dechlorierung in *D. hafniense* Y51 ist der Verlust des *pce*-Genclusters von Nachteil. Aus diesem Grund sollte eine konstant dechlorierende Variante des Stammes erzeugt bzw. isoliert werden, bei der eine Transposition des Genclusters nicht mehr möglich ist. Die Etablierung eines genetischen Systems für *D. hafniense* Y51 zur gezielten Mutagenese war bis jetzt jedoch nicht erfolgreich (Anita Mac Nelly, persönliche Mitteilung). Bei Kultivierung von *D. hafniense* Y51 in Abwesenheit von PCE (mit externer Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle) zeigte sich, dass eine Co-Kultur von dechlorierenden und nicht-dechlorierenden Varianten in einer Kultur entstehen kann. Dies scheint vor allem der Fall zu sein, wenn es während der Subkultivierung zu einer kontinuierlichen Bildung des PceA-Proteins kommt (Abb. 3-15 D, LZK1). Unter diesen Bedingungen stellte sich nach circa 30 Subkulturen ein konstantes *pceA*-Genlevel ein (Abb. 3-18). Dies spricht für eine Co-Existenz von dechlorierenden und nicht-dechlorierenden Varianten, wobei es für keine der beiden unter den experimentellen Bedingungen einen Wachstumsvorteil zu geben schien. Die Anwesenheit dechlorierender Varianten zeigte sich auch bei anschließender Kultivierung der Zellen in Anwesenheit von PCE, bei der die dechlorierenden Varianten einen deutlichen Wachstumsvorteil gegenüber den nicht-dechlorierenden Varianten besaßen. Entsprechend kam es zu einem raschen Anstieg von *c*DCE in den Kulturen, dem Endprodukt der reduktiven Dechlorierung in *D. hafniense* Y51 (Reinhold 2008). Aus diesem Grund wurde die Subkultur 60 dieser Subkultivierung (LZK1) für die Isolierung dechlorierender Varianten genutzt. Nach Gewinnung von Einzelkolonien wurden die Klone (10 Isolate) hinsichtlich ihrer Fähigkeit zum Abbau von PCE untersucht. Dafür wurden die einzelnen Isolate für 24 bis 48 Stunden in Anwesenheit von PCE kultiviert und anschließend der Umsatz von PCE zu *c*DCE mittels Gaschromatographie bestimmt. Auf diese Weise wurden 3 dechlorierende und 7 nicht-dechlorierende Klone identifiziert (Tab. 3-3).

Um zu untersuchen ob bei dem nah verwandten *D. hafniense* PCE-S ebenfalls dechlorierende und nicht-dechlorierende Varianten nebeneinander existieren, wurde hier eine Subkultivierung in Abwesenheit von PCE mit externer Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle untersucht, bei der es zu einem Verlust des Apoproteins und der dechlorierenden Aktivität nach 35 Subkulturen kam (LZK3). Auch hier konnte durch die Anwesenheit von PCE die dechlorierende Aktivität wieder gesteigert werden, was für die Anwesenheit dechlorierender Varianten des Stammes spricht (Reinhold 2008). Lediglich ein dechlorierender Klon wurde bei Untersuchung von insgesamt 88 Klonen identifiziert. Dementsprechend war in dieser Kultur das Verhältnis von dechlorierenden und nicht-dechlorierenden Varianten stärker in Richtung der nicht-



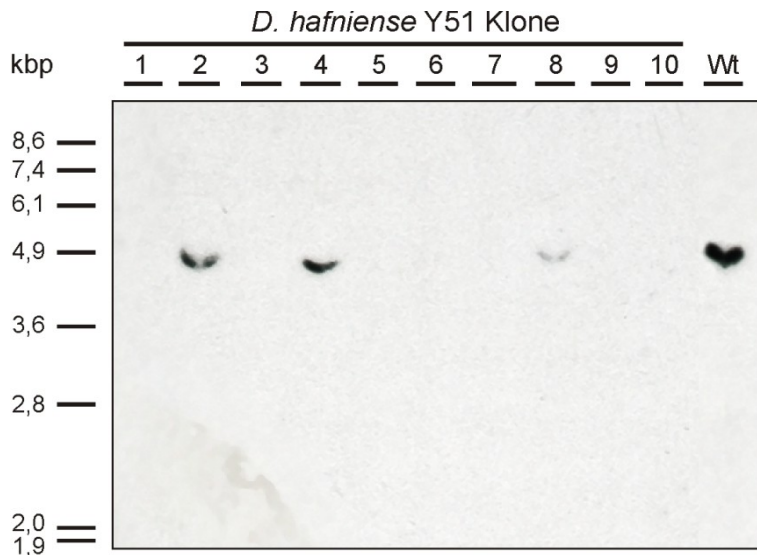
dechlorierenden Varianten verschoben, weshalb vermutlich weder das Apoprotein, noch eine dechlorierende Aktivität nachweisbar waren. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Transposition des Genclusters in Abwesenheit von PCE und die daraus resultierende Entstehung nicht-dechlorierender Varianten ebenfalls bei *D. hafniense* PCE-S von großer Bedeutung ist.

**Tabelle 3-3:** Bestimmung der *c*DCE-Menge im Medium bei Kultivierung der isolierten Klone von *D. hafniense* Y51 in Anwesenheit von PCE (mit externem Vitamin B<sub>12</sub>). Die *c*DCE-Menge wurde mittels Gaschromatographie bestimmt. OD - Optische Dichte, *c*DCE - *cis*-1,2-Dichlorethen.

<b><i>D. hafniense</i> Y51 Klon</b>	<b>OD<sub>578 nm</sub> (nach 48 h)</b>	<b><i>c</i>DCE<sub>gebildet</sub> (μM)</b>
1	0,150*	< 5
<b>2</b>	<b>0,848</b>	<b>460</b>
3	0,190*	< 10
<b>4</b>	<b>0,730</b>	<b>1045</b>
5	0,148*	< 10
6	0,117*	< 5
7	0,109*	< 10
<b>8</b>	<b>0,585</b>	<b>938</b>
9	0,122*	< 10
10	0,111*	< 5

\* nach 72 h hatte sich die OD<sub>578 nm</sub> nicht verändert

Für die molekularbiologische Analyse der Isolate von *D. hafniense* Y51 wurden zunächst Southern Blot-Analysen durchgeführt. Hierfür wurde die isolierte genomische DNA der Klone und des Wildtyps von *D. hafniense* Y51 mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten. Im Wildtyp lässt sich dadurch der *pce*-Gencluster auf zwei Restriktionsfragmenten nachweisen. Beide besitzen jeweils eine Größe von circa 5 kbp. Der Nachweis des Restriktionsfragmentes, welches das *pceA*-Gen beinhaltet, erfolgte schließlich mit einer spezifischen Gensonde gegen *pceA*. Bei allen drei dechlorierenden Klonen wie auch in dem Wildtyp von *D. hafniense* Y51 konnte dieses Fragment nachgewiesen werden (Abb. 3-21). Die leichten Schwankungen in den Größen der Restriktionsfragmente könnten durch die Elektrophorese bedingt sein, da die Banden einen leichten „Smile“-Effekt aufwiesen. Bei allen nicht-dechlorierenden Varianten von *D. hafniense* Y51 konnte kein *pceA*-Gen nachgewiesen werden, was auf den Verlust des *pceA*-Gens und möglicherweise des gesamten *pce*-Genclusters hindeutet.

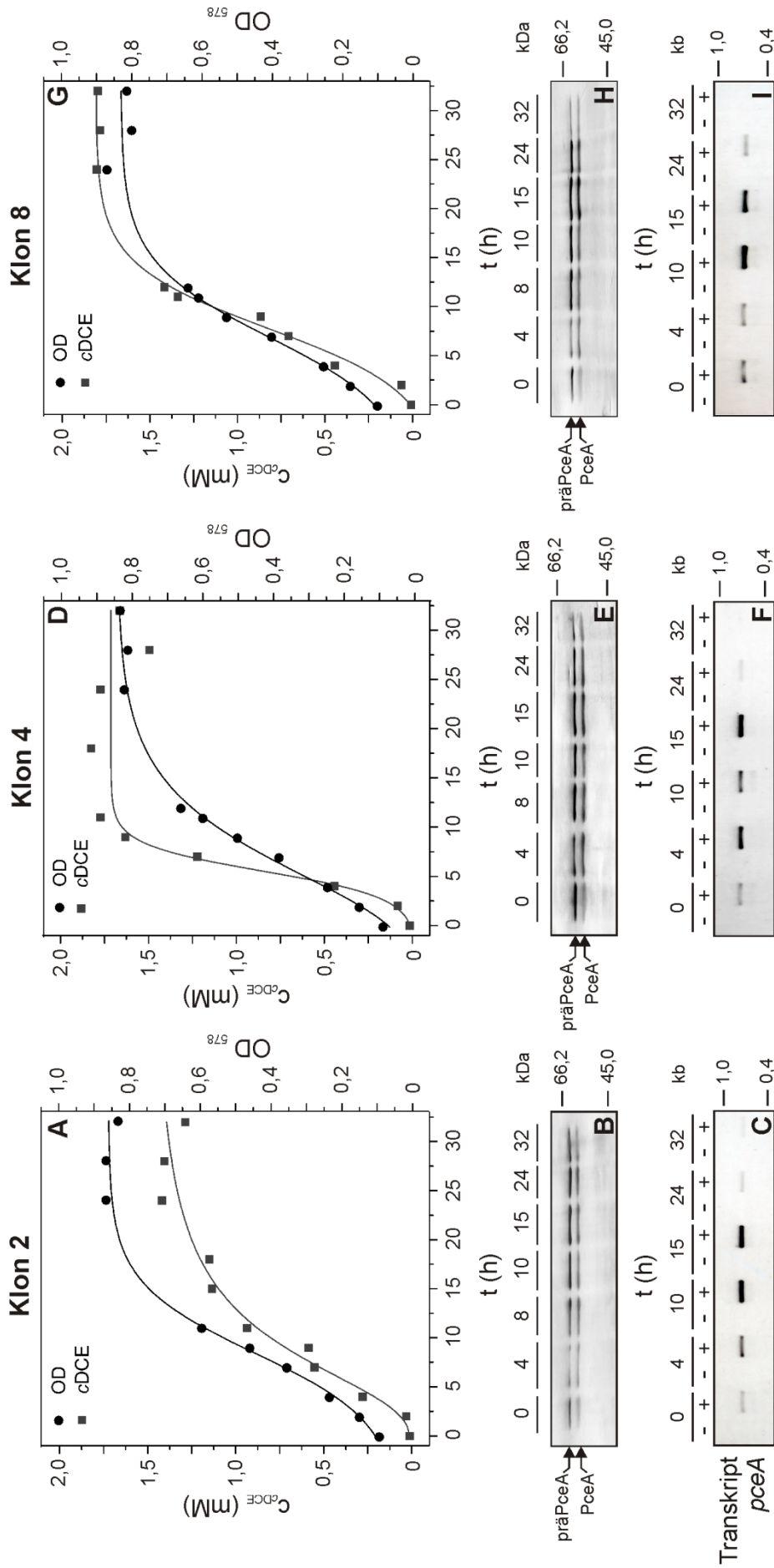


**Abbildung 3-21:** Nachweis des *pceA*-Gens im Genom der isolierten Klone (siehe Tab. 3-3) von *D. hafniense* Y51 mittels Southern Blot. Die Zellen wurden zuvor für 60 Subkulturen in Abwesenheit von PCE (mit externem Vitamin B<sub>12</sub>) kultiviert. Der Nachweis des *pce*-Genclusters erfolgte mit einer spezifischen Sonde gegen *pceA*. Wt - Wildtyp.

### 3.3.2.2 Induktion und Stabilität der dechlorierenden Aktivität

Zur Untersuchung der Induktion des Abbaus von Tetrachlorethen (PCE) wurden die dechlorierenden Klone (siehe Tabelle 3-3) für 32 Stunden in Anwesenheit von PCE mit Pyruvat als Elektronendonator kultiviert (10% Inokulum, mit externem Vitamin B<sub>12</sub>). Alle Kulturen wiesen eine kurze lag-Phase (~ 2 Stunden) auf und erreichten innerhalb von 24 Stunden die stationäre Wachstumsphase (Abb. 3-22 A, D, G). Unmittelbar nach Inokulation wurde die Umsetzung von PCE durch Bildung von *cis*-1,2-Dichlorethen (*cDCE*) mittels Gaschromatographie nachgewiesen. Bei den Klonen 2 und 8 konnte die höchste *cDCE*-Konzentration im Medium nach 24 Stunden gemessen werden, bei Klon 4 war dies bereits nach 10 Stunden der Fall (Abb. 3-22 A, D, G). Zudem konnte bei Klon 4 bereits nach 4 Stunden eine signifikante Zunahme des *pceA*-Transkripts verzeichnet werden. Im Vergleich dazu zeigte sich bei Klon 2 und 8 erst nach circa 10 Stunden eine signifikante Zunahme der *pceA*-Transkriptmenge (Abb. 3-22 C, F, I). In allen Klonen war bereits zu Beginn der Kultivierung PceA-Protein vorhanden (Abb. 3-22 B, E, H), was den schnellen Umsatz von PCE erklärt. Die Menge an PceA blieb während der Kultivierung nahezu konstant. Lediglich bei Klon 8 konnte eine Zunahme der PceA-Menge zu Beginn der Kultivierung bzw. Abnahme in der stationären Wachstumsphase beobachtet werden (Abb. 3-22 H). In allen Fällen wurde sowohl die Vorläuferform von PceA als auch das gereifte Protein nachgewiesen. Nicht-dechlorierenden Klone von *D. hafniense* Y51 wiesen unter den gleichen Kultivierungsbedingungen kein Wachstum auf.

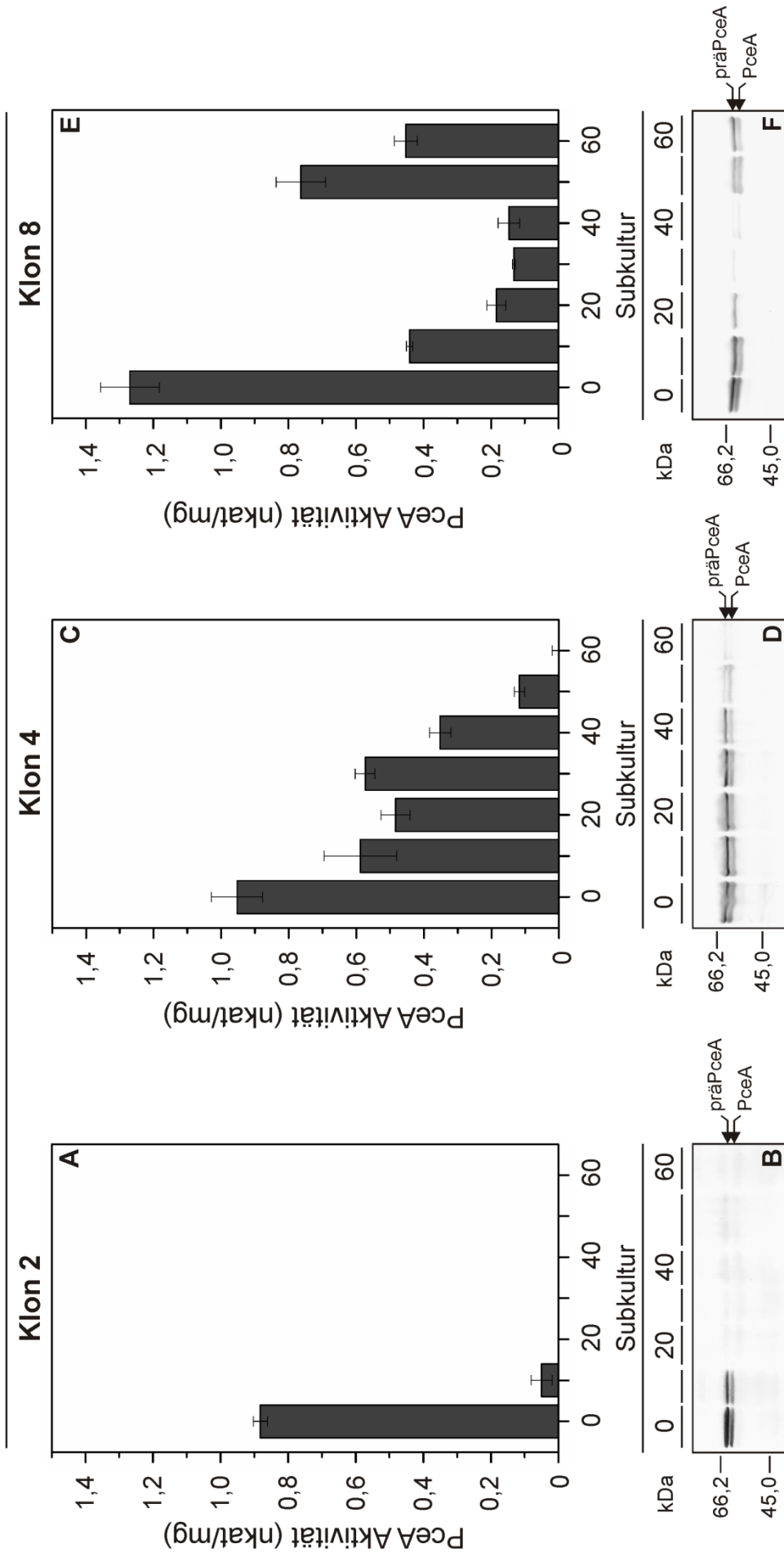
Kultivierung in Anwesenheit von PCE



**Abbildung 3-22:** Induktion des PCE-Abbaus in *D. hafniense* Y51 Klon 2, 4 und 8 (siehe Tab. 3-3). Die Kultivierung erfolgte in Anwesenheit von PCE (mit externer Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle). (**A, D, G**) Dargestellt ist die Änderung der optischen Dichte bei 578 nm und Bildung von *cis*-1,2-Dichloroethen (*cDCE*). (**B, E, H**) Immunoblot mit PceA-spezifischen Antikörpern. Pro Spur wurden 5 µg Gesamtprotein aufgetragen. (**C, F, I**) RT-PCR zum Nachweis des *pceA*-Transkripts (mit 1,25 µg RNA). Pro Spur wurden 2 µl des PCR-Ansatzes aufgetragen.

Eine erneute Subkultivierung der dechlorierenden Klone von *D. hafniense* Y51 in Abwesenheit von PCE sollte im Folgenden Aufschluss über die Stabilität des *pce*-Genclusters in deren Genom geben. Die Subkultivierung erfolgte jeweils über 60 Subkulturen, wobei alle 10 Subkulturen die PceA-Aktivität und das PceA-Proteinlevel bestimmt wurden (Abb. 3-23). Dieses Experiment ergab für alle drei Klone vollkommen unterschiedliche Ergebnisse. Für Klon 2 wurde ein kompletter Verlust der PceA-Aktivität (Abb. 2-23 A) und des PceA-Proteins (Abb. 3-23 B) nach 20 Subkulturen beobachtet. Bei Klon 4 waren insgesamt 60 Subkulturen notwendig bis ein vollständiger Verlust der PceA-Aktivität und des PceA-Proteins (Abb. 3-23 C, D) eintrat. Bei Klon 8 wurde zunächst ein Rückgang des PceA-Proteins bis Subkultur 30 beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt betrug die PceA-Aktivität noch circa 10% der Ausgangsaktivität und das PceA-Protein war per Immunoblot kaum nachweisbar (Abb. 3-23 F). Nach etwa 50 Subkulturen wurde wieder ein Anstieg der PceA-Aktivität verzeichnet, welche jedoch nur etwa 60% der ursprünglichen Aktivität erreichte. Zeitgleich konnte auch eine Zunahme des PceA-Proteins im Immunoblot beobachtet werden (Abb. 3-23 F). Nach 60 Subkulturen in Abwesenheit von PceA konnte für Klon 8 immer noch dechlorierende Aktivität nachgewiesen werden. Diese betrug jedoch nur 35% des Ausgangswertes. Der Vergleich der Klone zeigte, dass möglicherweise bei Klon 8 der *pce*-Gencluster stabil im Genom integriert ist. Vor allem bei Klon 2, aber auch bei Klon 4 ist die Transposition sehr stark verzögert, weshalb mehr als 60 Subkulturen in Abwesenheit von PCE für den Verlust des *pceA*-Gens notwendig sind. Deshalb war es vermutlich möglich, diese Klone zu isolieren, obwohl der *pce*-Gencluster nicht stabil im Genom integriert war.

Kultivierung in Abwesenheit von PCE

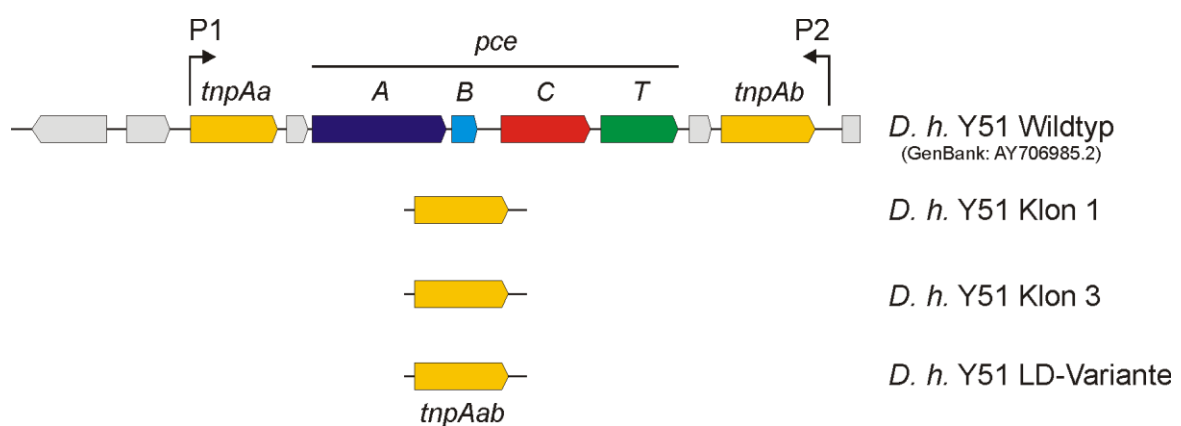


**Abbildung 3-23:** Subkultivierung von *D. hafniense* Y51 Klon 2, 4 und 8 (siehe Tab. 3-3) in Abwesenheit von PCE (10% Inokulum, mit externer Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle). Alle 10 Subkulturen wurden die PceA-Aktivität (**A, C, E**) und das PceA-Proteinlevel (**B, D, F**) bestimmt. Die Detektion von PceA erfolgte im Immunoblot mit PceA-spezifischen Antikörpern. Pro Spur wurden 5 µg Gesamtprotein aufgetragen.

### 3.3.2.3 Molekularbiologische Analyse der Varianten von *D. hafniense* Y51

#### *Nicht-dechlorierende Varianten*

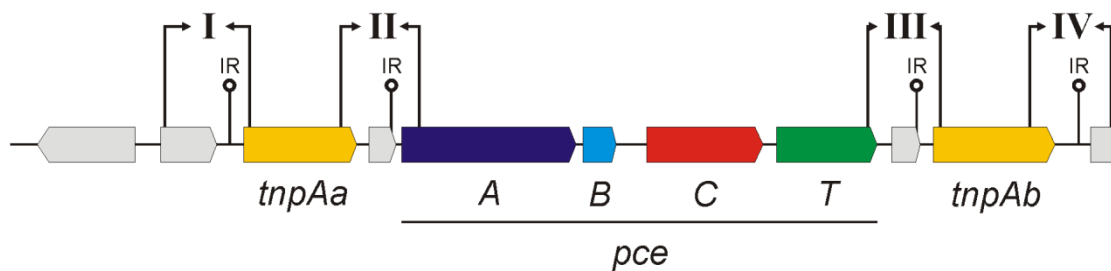
Die Southern Blot-Analyse der nicht-dechlorierenden Klone (Abb. 3-21) zeigte die Abwesenheit des *pceA*-Gens in diesen Varianten von *D. hafniense* Y51. Um zu klären, ob es sich dabei um einen kompletten Verlust des *pce*-Genclusters aus dem Genom handelt, wie dies bei der LD-Variante von *D. hafniense* Y51 der Fall ist (Futagami et al. 2006), wurde der Bereich des *pce*-Genclusters amplifiziert und sequenziert. Für die Amplifikation wurden Primer gewählt, die außerhalb des Genclusters lagen (Abb. 3-24, P1 und P2). Bei Anwesenheit eines vollständigen *pceABCT*-Genclusters entsteht ein Produkt mit einer Größe von ungefähr 7,9 kbp. Im Falle der Transposition des gesamten *pce*-Genclusters würde hingegen auf Grund des Verlustes von *pceABCT* und einem Transposasegen ein Fragment von 1,6 kbp entstehen. Die Sequenzierung der nicht-dechlorierenden Varianten wurde exemplarisch für die Klone 1 und 3 durchgeführt (Abb. 3-24). Für beide Klone konnte ein 1,6 kbp-Fragment amplifiziert werden. Die Sequenzierung der Fragmente bestätigte anschließend den kompletten Verlust des *pce*-Genclusters. Als Kontrolle diente die LD-Variante von *D. hafniense* Y51. Die Sequenz der amplifizierten Fragmente der isolierten Klone und der LD-Variante stimmten überein. In allen Fällen konnte nur ein für eine Transposase kodierendes Gen nachgewiesen werden, wobei aufgrund der starken Homologie nicht zwischen den Genen *tnpAa* und *tnpAb* unterschieden werden konnte (Abb. 3-24). Deshalb wurde das verbleibende Gen mit *tnpAab* bezeichnet (siehe auch Futagami et al. 2006).



**Abbildung 3-24:** Analyse der nicht-dechlorierenden Klone (Klon 1 und 3) und der LD-Variante von *D. hafniense* Y51 hinsichtlich des Verlustes des *pce*-Genclusters aus dem Genom. P1, P2 - Primer zur Amplifikation des *pce*-Genclusters.

### Dechlorierende Varianten

Für die molekularbiologische Analyse der dechlorierenden Klone wurden die Bereiche, in denen Inverted Repeats vorliegen, sequenziert (Futagami et al. 2006). Diese Inverted Repeats stellen Erkennungssequenzen für die Transposasen während der Exzision des *pce*-Genclusters dar. Eine Veränderung dieser Sequenzen wäre eine mögliche Erklärung für die Stabilität eines *pce*-Genclusters im Genom von *D. hafniense* Y51. Von besonderem Interesse war Klon 8 von *D. hafniense* Y51, welcher selbst bei erneuter Subkultivierung in Abwesenheit von PCE den *pce*-Gencluster im Genom behielt (Abb. 3-23 E, F). In Abbildung 3-25 sind die Inverted Repeats (IR) und die sequenzierten Bereiche (I, II, III, IV) markiert.



**Abbildung 3-25:** Übersicht über die im Bereich des *pceABCT*-Genclusters sequenzierten Abschnitte (römische Ziffern) der dechlorierenden Varianten von *D. hafniense* Y51 (GenBank: AY706985.2). IR - Inverted Repeat.

Im Bereich der Inverted Repeats konnten jedoch bei allen Klonen keine Sequenzveränderung gefunden werden. Folglich muss es andere Gründe für die Stabilität des *pce*-Genclusters geben. Möglicherweise liegen genetische Veränderungen der Transposasengene vor oder es bestehen andere Mechanismen, welche die Transposition des *pceABCT*-Genclusters ermöglichen oder verhindern. Weitere molekularbiologische Analysen der Klone müssen folgen, um die Ursache und den Mechanismus für die Transposition des *pce*-Genclusters aus dem Genom von *D. hafniense* Y51 aufzuklären.

### 3.4 Interaktion der PCE-Dehalogenase mit dem mutmaßlichen Membrananker PceB

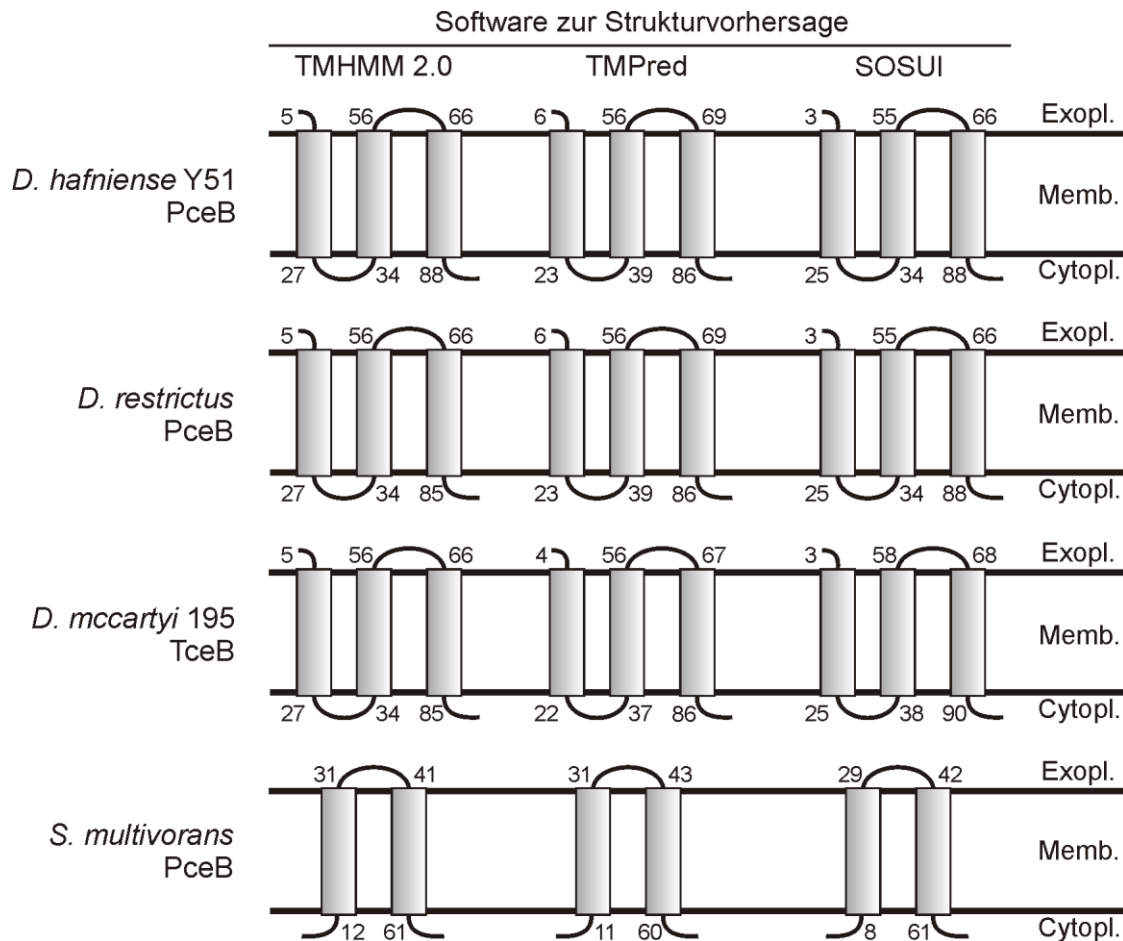
Die PCE-Dehalogenase (PceA) als Tat-Substrat wird nach dem Einbau des Corrinoid-Cofaktors und der Eisen-Schwefel-Zentren über die Cytoplasmamembran ins Exoplasma transportiert. Während des Transports erfolgt die Abspaltung des Signalpeptids und es entsteht die gereifte Form der PCE-Dehalogenase. Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich PceA im Exoplasma an der Außenseite der Cytoplasmamembran befindet (Reinhold 2008; Abb. 3-1). Ob diese Lokalisation auf der Interaktion zwischen PceA und dem mutmaßlichen Membrananker PceB beruht, sollte untersucht werden.

#### 3.4.1 Der mutmaßliche Membrananker PceB

##### *Strukturanalyse*

In *D. hafniense* Y51 wird der mutmaßliche Membrananker PceB durch das Gen *pceB* (DSY2840) kodiert. Dieses ist wie *pceA* im Gencluster *pceABCT* lokalisiert. Bisher wurde weder die Bildung von PceB nachgewiesen noch konnte die vermutete Rolle des Proteins als Membrananker experimentell bestätigt werden. PceB besteht aus 105 Aminosäuren und besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 11,8 kDa. Zur *in silico* Strukturanalyse des PceB-Proteins wurden die Analyseprogramme TMHMM 2.0, TmPred und SOSUI (siehe Material und Methoden) verwendet und verglichen (Abb. 3-26). Alle Programme sagten für PceB drei transmembrane Helices vorher (Abb. 3-26). Lediglich bei den genauen Positionen der Helices im Protein kam es zu geringen Abweichungen. Laut Vorhersage soll der N-Terminus des Proteins auf der exoplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran liegen, der C-Terminus hingegen auf der cytoplasmatischen Seite. Der Vergleich von PceB aus *D. hafniense* Y51 mit PceB aus *Dehalobacter restrictus* und TceB aus *Dehalococcoides mccartyi* 195 lässt keine signifikanten Unterschiede erkennen. Das PceB-Protein von *Sulfurospirillum multivorans* hingegen besitzt lediglich zwei transmembrane Helices. Zudem befinden sich laut Vorhersage der C- und N-Terminus des Proteins auf der cytoplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran. Zwischen den verwendeten Programmen bestanden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Topologie der verschiedenen PceB-Proteine, was die Wahrscheinlichkeit für das Zutreffen der vorhergesagten Struktur für das native PceB-Protein von *D. hafniense* Y51 erhöht.

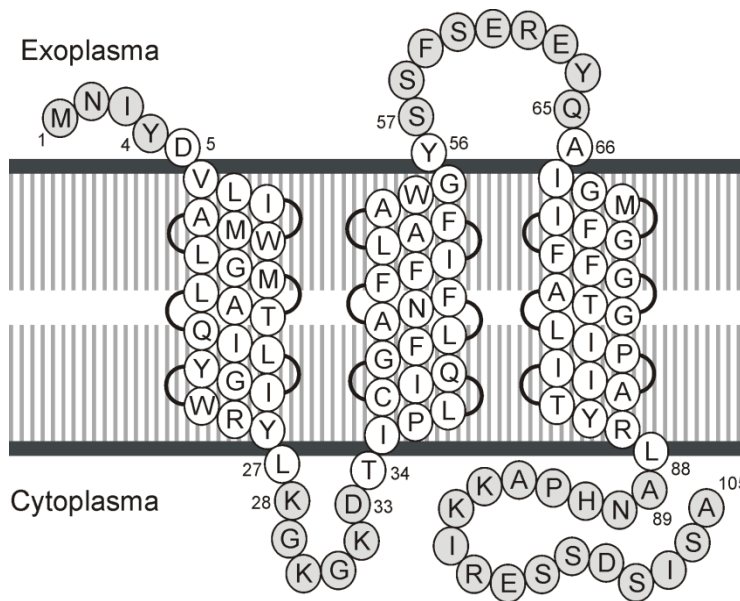




**Abbildung 3-26:** Strukturvorhersage für PceB aus *Desulfotobacterium hafniense* Y51 (YP\_519071.1), *Dehalobacter restrictus* (CAD28791.1), *Sulfurospirillum multivorans* (AAC60789.1) sowie für TceB aus *Dehalococcoides mccartyi* TceB (AAW39061.1). Zur Vorhersage wurden die Programme TMHMM 2.0 (Sonnhammer et al. 1998), TmPred (Hofmann et al. 1993) und SOSUI (Hirokawa et al. 1998) verwendet.

Die Analyse verschiedener Strukturanalyseprogramme durch Möller et al. (2001) zeigte, dass die Software TMHMM 2.0 die größte Treffsicherheit aufwies. Auf Grundlage der Strukturanalyse durch dieses Programm wurde ein Modell für PceB erstellt (Abb. 3-27).

Bei PceB handelt es sich um ein Protein mit zahlreichen hydrophoben Aminosäuren, weshalb die vorhergesagte membran-integrale Lokalisation nachvollziehbar ist. Die Hydrophobizität von Proteinen kann durch den sogenannten GRAVY-Wert (grand average of hydrophobicity; Kyte et al. 1982) ausgedrückt werden, der die hydrophoben und hydrophilen Eigenschaften der Aminosäuren sowie deren Häufigkeit im Protein berücksichtigt. Für Proteine mit einer hohen Hydrophobizität liegt dieser Wert im positiven Bereich. Hydrophile Proteine hingegen besitzen einen negativen GRAVY-Wert. Zur Überprüfung der hydrophoben Eigenschaften von PceB wurden die GRAVY-Werte verschiedener reduktiver Dehalogenasen und die ihrer mutmaßlichen Membrananker-Proteine bestimmt (Tab. 3-4).



**Abbildung 3-27:** Struktur von PceB aus *D. hafniense* Y51 basierend auf der Analyse der Aminosäuresequenz mittels TMHMM 2.0 (Sonnhammer et al. 1998).

**Tabelle 3-4:** GRAVY-Werte reduktiver Dehalogenasen und der zugehörigen mutmaßlichen Membrananker. Für *D. hafniense* Y51 erfolgte zudem die Angabe der GRAVY-Werte für PceC und PceT. Die Kalkulation basierte auf den Hydrophobizitätswerten der einzelnen Aminosäuren (Kyte et al. 1982).

Organismus	Protein	GRAVY-Wert
<i>D. hafniense</i> Y51	PceA	- 0,434
	PceB	0,475
	PceC	0,337
	PceT	- 0,425
<i>D. restrictus</i>	PceA	- 0,431
	PceB	0,476
<i>D. mccartyi</i> 195	TceA	- 0,440
	TceB	0,680
<i>S. multivorans</i>	PceA	- 0,314
	PceB	0,843

Für *D. hafniense* Y51 wird ersichtlich, dass PceA und PceT einen negativen GRAVY-Wert, PceB und PceC hingegen einen positiven GRAVY-Wert aufweisen. Dementsprechend erwartet man PceA und PceT löslich im Cytoplasma bzw. Exoplasma. Dies konnte für beide Proteine auch gezeigt werden (Reinhold 2008; Abb. 3-3). Der positive GRAVY-Wert von PceB und PceC lässt auf ihre hydrophoben Eigenschaften schließen. Die Strukturvorhersage von PceC mit den oben genannten Programmen zeigte ebenfalls eine membran-integrale Lokalisation des Proteins, wobei jedoch 5 transmembrane Helices ausgebildet werden. Vergleichbare GRAVY-Werte lassen sich für die reduktiven Dehalogenase bzw. den dazugehörigen Membrananker PceB/ TceB aus *D. restrictus*, *D. mccartyi* 195 bestimmen.

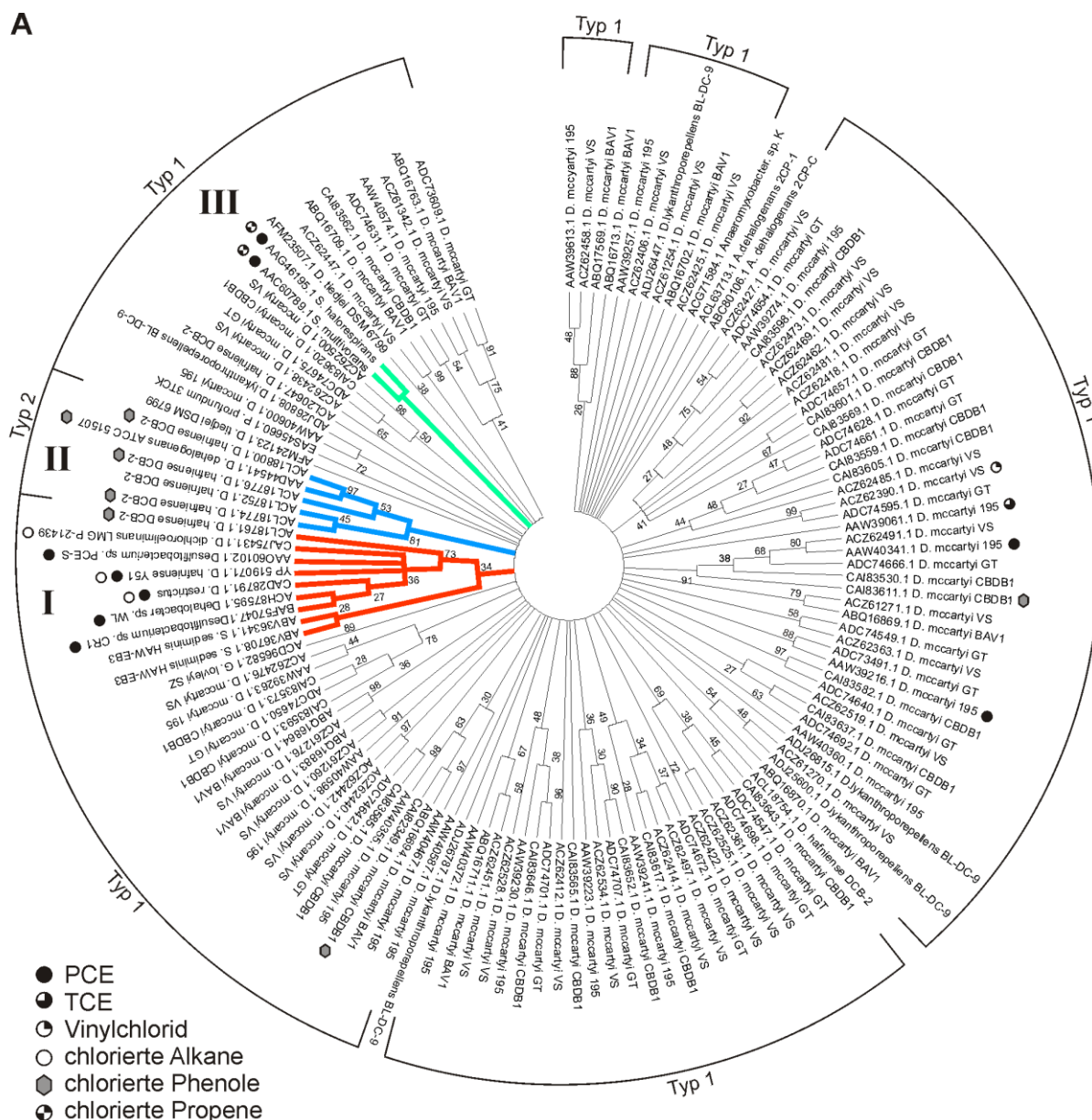
Deutliche Unterschiede bestehen jedoch zu PceB aus *S. multivorans*. Der GRAVY-Wert dieses Proteins ist fast doppelt so groß wie die Werte der anderen Membrananker-Proteine. Hier besteht das PceB-Protein immerhin zu 64% aus hydrophoben Aminosäuren. Im Vergleich dazu bestehen die B-Proteine aus *D. hafniense* Y51, *D. restrictus* und *D. mccartyi* 195 nur zu 56 - 59% aus hydrophoben Aminosäuren.

### *Phylogenetische Analyse*

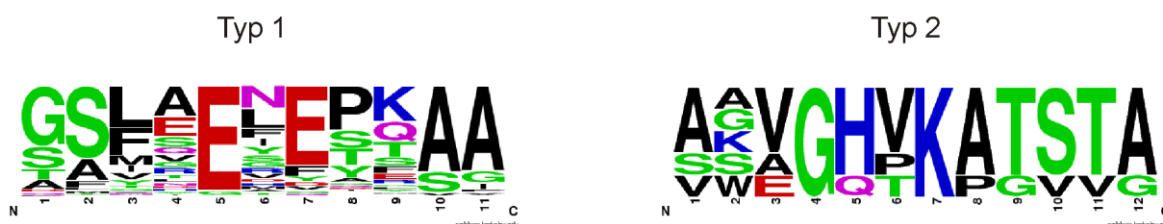
Proteine, die als Membrananker für reduktive Dehalogenasen dienen, lassen sich in vielen Mikroorganismen nachweisen, die zur Dehalogenierung befähigt sind. Im Folgenden werden sie als RdhB (Rdh = *reductive dehalogenase homologue*) bezeichnet. Ausgehend von PceB aus *D. hafniense* Y51 bzw. TceB aus *D. mccartyi* 195 wurden mittels BLAST insgesamt 134 homologe RdhB-Proteine aus 24 reduktiv dehalogenierenden Mikroorganismen identifiziert. Die Erstellung des phylogenetischen Stammbaumes der RdhB-Proteine erfolgte auf Grundlage des Maximum Likelihood-Algorithmus unter Verwendung des Programms MEGA 5.0 (Abb. 3-28 A; Tamura 2011). Zwischen den RdhB-Proteinen lassen sich kaum verwandschaftliche Beziehungen erkennen, was durch die geringe Anzahl an Clustern und die niedrigen Bootstrap-Werte (< 50) deutlich wird. Vor allem RdhB-Proteine aus Organismen der Gattung *Dehalococcoides* spec. bilden überwiegend kleine Cluster mit Bootstrap-Werten < 50. Zudem sind diese RdhB-Proteine über den gesamten Stammbaum verteilt. RdhB-Proteine hingegen, die der Gattung *Desulfitobacterium* spec. zugeordnet werden, befinden sich vornehmlich in den Clustern I und II (Abb. 3-28 A). Ausnahmen stellen lediglich die Proteine ACL20647.1 und ACL18754 aus *D. hafniense* DCB-2 dar. Beide Proteine sind in transkriptionell inaktiven *rdh*-Genclustern kodiert (Kim et al. 2012), was ihre Funktion als Membrananker in *D. hafniense* DCB-2 fraglich erscheinen lässt. Die Cluster I und II weisen hohe Bootstrap-Werte auf, was eine phylogenetische Verwandtschaft der beinhalteten RdhB-Proteine wahrscheinlich macht. Cluster I besitzt einen Bootstrap-Wert von 73, wenn man von der Zuordnung des B-Proteins von *Shewanella sediminis* absieht. Cluster II weist sogar einen Bootstrap-Wert von 81 auf. Cluster I und II unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der Substrate, die von den zugehörigen reduktiven Dehalogenasen umgesetzt werden können. In Cluster I befinden sich vornehmlich RdhBs, deren reduktive Dehalogenasen Tetrachlorethen bzw. chlorierte Alkane abbauen können (Schumacher et al. 1996, Miller et al. 1997, Suyama et al. 2001, Maillard et al. 2003, de Wildeman et al. 2003). Cluster II zeichnet sich dagegen durch chlorierte Phenole als mögliche Substrate für die reduktiven Dehalogenasen aus (Utkin et al. 1994, Kim et al. 2012). Eine Ausnahme stellt dabei das Protein ACL18800.1 aus *D.*

*hafniense* DCB-2 dar. Die Expression der kodierenden Gene wird durch chlorierte Phenole gesteigert (Kim et al. 2012), dennoch befindet sich das RdhB-Protein im Cluster I. Betrachtet man jedoch die Struktur des Genclusters, so erkennt man, dass dieser den gleichen Aufbau wie die *pceABCT*-Gencluster aus *D. hafniense* Y51 bzw. PCE-S besitzt, was eine mögliche Erklärung für die Einordnung in Cluster I ist. Die meisten reduktiven Dehalogenasen wurden im Bezug auf ihr Substratspektrum bisher jedoch nicht weiter charakterisiert. Deshalb bleibt eine mögliche Korrelation zwischen der Gruppierung der RdhB-Proteine und der Art der chlorierten Substrate, die durch die zugehörigen reduktiven Dehalogenase umgesetzt werden, spekulativ.

Die PceB-Proteine von *S. multivorans* und *S. halorespirans* weisen ebenfalls einen hohen Verwandtschaftsgrad auf (Abb. 3-28, Cluster III), sind aber verwandtschaftlich deutlich entfernt von den RdhB-Proteinen der Cluster I und II. Der unterschiedliche Aufbau der PceB-Proteine (2 transmembrane Helices im Vergleich zu 3 transmembranen Helices bei *D. hafniense* Y51) ist vermutlich die Ursache für diese abweichende Einordnung. Interessanterweise sortieren sich die RdhB-Proteine aus *Shewanella sediminis* HAW-EB3 und *Geobacter lovleyi* SZ in unmittelbarer Nähe zu Cluster I und Cluster II ein. Die Fähigkeit von *Geobacter lovleyi* SZ, reduktiv zu dehalogenieren, ist bislang einzigartig innerhalb dieser Gattung. Die Analyse des Genoms zeigte, dass die kodierenden Gene für die Dehalogenase und den mutmaßlichen Membrananker vermutlich durch lateralen Gentransfer aufgenommen wurden (Wagner et al. 2012). Der Ursprung der Gene ist unklar, jedoch besitzen sie die höchste Ähnlichkeit mit den *pce*-Genen aus Organismen der Gattung *Desulfitobacterium* spec.. Vermutlich ist dies die Ursache für die phylogenetische Nähe der RdhB-Proteine zu Cluster I und II.



**B** Konsensussequenz der putativen exoplasmatischen Loops

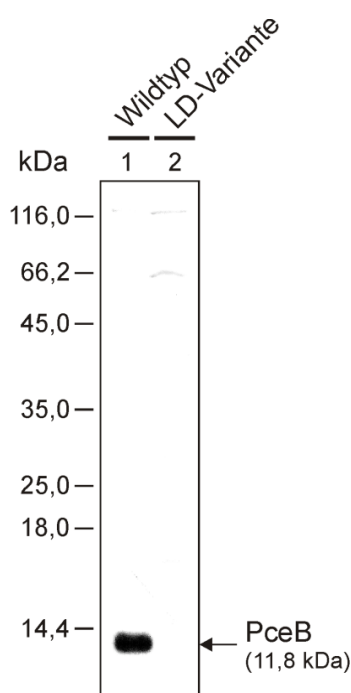


**Abbildung 3-28:** (A) Phylogenetischer Stammbaum der RdhB-Proteine verschiedener dechlorierender Mikroorganismen. Die Erstellung des Stammbaums erfolgte mit MEGA 5.0 (Tamura 2011). Es wurden 134 RdhB-Proteine ausgewertet. Die Symbole an den Proteinen geben die Substrate der zugehörigen reduktiven Dehalogenasen an. (B) Weblogo der Konsensussequenz des mutmaßlichen exoplasmatischen Loops. Bei Typ 1 wurden 123 RdhB-Proteine ausgewertet. Typ 2 entspricht der Auswertung von 5 RdhBs.

Allen RdhB-Proteinen wird eine Membran durchspannende subzelluläre Lokalisation mit Ausbildung eines exoplasmatischen Loops vorausgesagt. Dieser Loop könnte eine potentielle Interaktionsstelle für die reduktiven Dehalogenase im Exoplasma der Zellen darstellen. Die Analyse der Aminosäuresequenz des Loops der RdhB-Proteine ergab 2 unterschiedliche Typen (Abb. 3-28 B). Der weitaus häufigere Typ 1 besitzt zwei hoch konservierte Aspartatreste (Abb. 3-28 B, Position 5 und 7). Der zweite Typ des exoplasmatischen Loops weist einen konservierten Glycin- (Position 4), Histidin- (Position 5) und Lysinrest (Position 7) auf. Dieser Typ bleibt jedoch auf die RdhB-Proteine des Clusters II beschränkt. Desweiteren gab es einige RdhB-Proteine, deren Aminosäuresequenzen des exoplasmatischen Loops sich keinem der beiden Typen zuordnen ließen.

### Subzelluläre Lokalisation

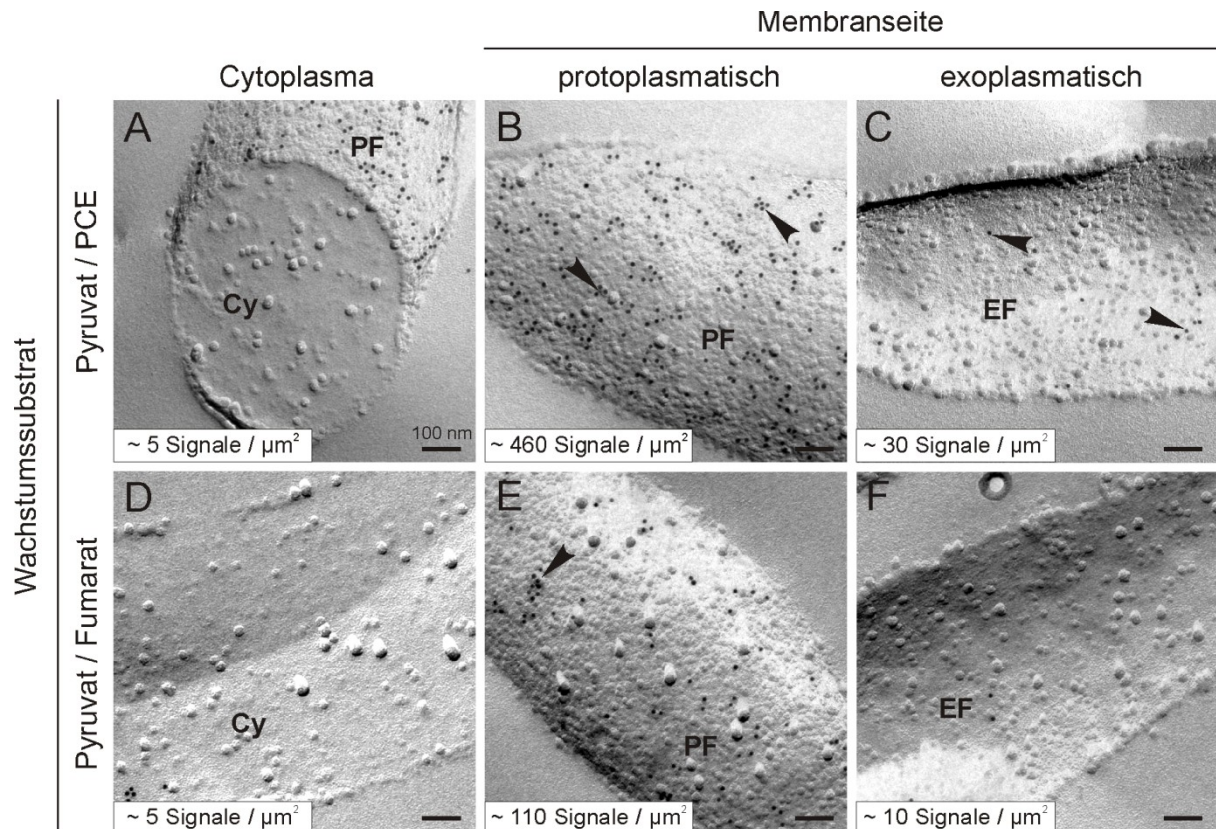
Die Analyse der Struktur des PceB-Proteins aus *D. hafniense* Y51 ließ eine Membran-integrale subzelluläre Lokalisation des Proteins vermuten. Zur Detektion von PceB in Zellen von *D. hafniense* Y51 wurde ein Antikörper gegen den C-Terminus von PceB verwendet (Abb. 3-27; Aminosäuren 89-105). Dieser Antikörper wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Kensuke Furukawa und Dr. Taiki Futagami (Kyushu Universität, Fukuoka, Japan) zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe dieses Antikörpers konnte erstmals die Bildung von PceB in den Zellen von *D. hafniense* Y51 nachgewiesen werden (Abb. 3-29, Spur 1). Die Zellen wurden hierfür in Anwesenheit von PCE kultiviert. Eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit anderen Proteinen konnte weder in den Zellen des Wildtyps noch in denen der LD-Variante des Stammes detektiert werden (Abb. 3-29, Spur 2).



**Abbildung 3-29:** Nachweis von PceB in Zellextrakten von *D. hafniense* Y51. Die Kultivierung erfolgte in Anwesenheit von PCE mit externem Vitamin B<sub>12</sub>. Als Kontrolle diente die LD-Variante des Stammes. Rohextrakte der Zellen wurden per SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und PceB mit spezifischen Antikörpern immunologisch nachgewiesen. Pro Spur wurden 5 µg Gesamtprotein aufgetragen.

Der spezifische Nachweis von PceB im Immunoblot ermöglichte elektronenmikroskopische Studien zur subzellulären Lokalisation des Proteins in Zellen von *D. hafniense* Y51. Die Kultivierung erfolgte in Anwesenheit bzw. in Abwesenheit von PCE (15 Subkulturen, 10% Inokulum). Die Präparation der Zellen wurde entsprechend der Lokalisationsstudien für PceA und PceT in *D. hafniense* Y51 durchgeführt. Um die Bindung des Antikörpers an PceB in den Replika zu verbessern, erfolgte jedoch eine umgekehrte Bedampfung der Replika mit Kohlenstoff und Platin (Schlörmann et al. 2007). Auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der verschiedenen Bruchflächen wurde PceB überwiegend auf der protoplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran detektiert (Abb. 3-30 B, E). Bei Kultivierung in Anwesenheit von PCE konnte auf dieser Bruchfläche eine viermal höhere Anzahl an PceB-Proteinen detektiert werden als bei Kultivierung in Abwesenheit von PCE. Dies deutet auf eine gesteigerte Synthese von PceB in Anwesenheit des Enzymsubstrates PCE hin. Die scheinbare Lokalisation von PceB auf der protoplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran kann durch die Spezifität des Antikörpers gegen den C-Terminus des Proteins erklärt werden (Abb. 3-26; Abb. 3-27). PceB wurde in sehr geringen Mengen im Cytoplasma der Zellen nachgewiesen (Abb. 3-30 A, D), wobei es sich möglicherweise um in der Synthese befindliches PceB-Protein handelt oder um Präparationsartefakte aufgrund lysierter Zellen. Daneben wurde ebenfalls eine geringe Anzahl an Signalen auf der exoplasmatischen Seite der Membran detektiert (Abb. 3-30 C, F). Hierbei könnte es sich um eine falsche Integration von PceB in umgekehrter Orientierung in die Cytoplasmamembran oder ebenfalls um Präparationsartefakte handeln.





**Abbildung 3-30:** Subzelluläre Lokalisation von PceB in *D. hafniense* Y51. Die Untersuchung erfolgte über Elektronenmikroskopie mit Immungoldmarkierung (FRIL) von PceB. Die Zellen wurden für 15 Subkulturen in Anwesenheit von PCE (A-C) bzw. in Abwesenheit von PCE (D-F) kultiviert. Als alternativer Elektronenakzeptor diente Fumarat. Dem Medium wurden 30 nM Cyanocobalamin als externe Vitamin B<sub>12</sub>-Quelle zugegeben. Die Abbildungen zeigen Gefrierbrüche durch das Cytoplasma (Cy), die protoplasmatische Bruchfläche (PF) und die exoplasmatische Bruchfläche (EF) der Cytoplasmamembran. Die Skalen in den einzelnen Abbildungen entsprechen jeweils 100 nm.

### 3.4.2 Studien zur Interaktion der PCE-Dehalogenase mit PceB

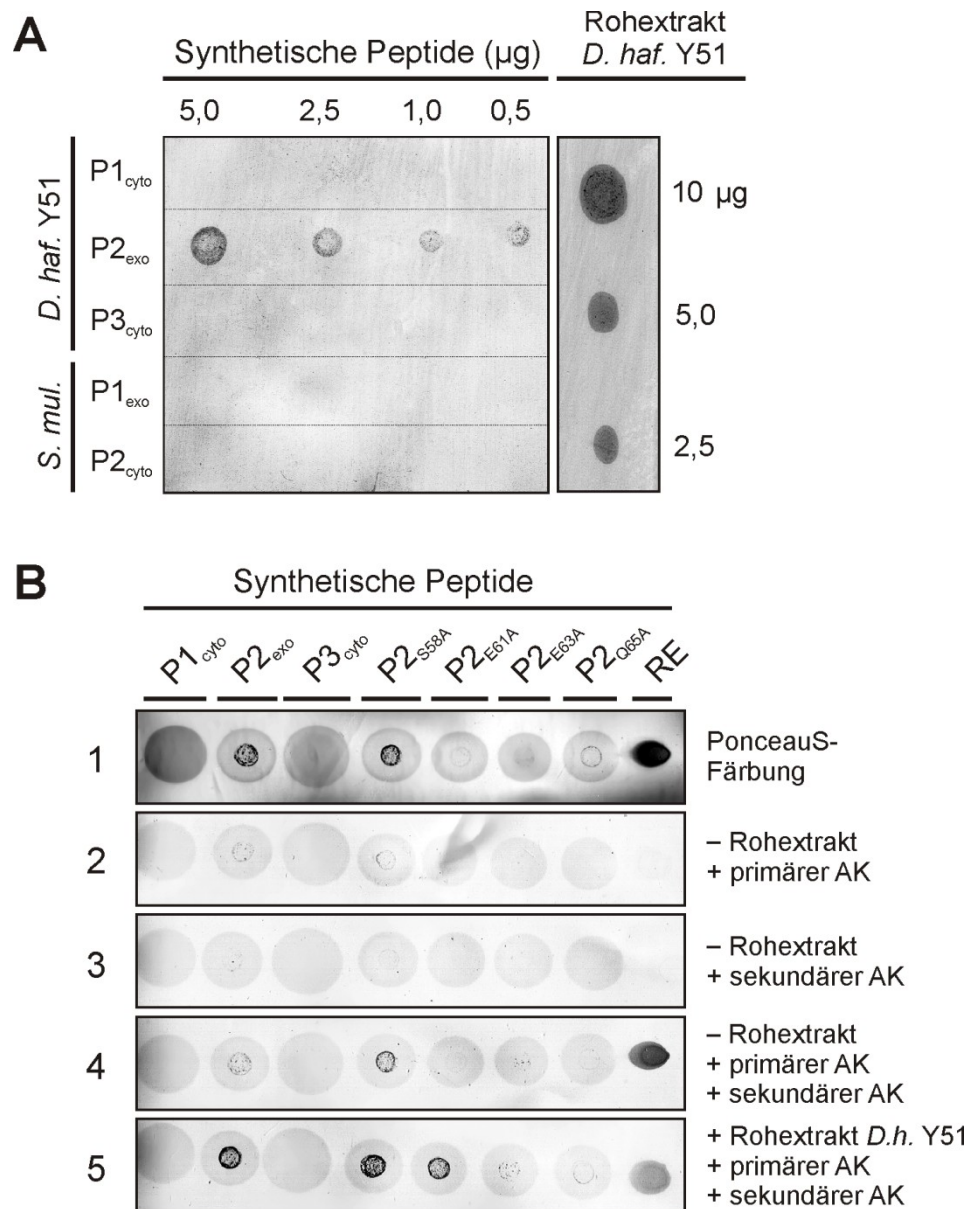
Der Nachweis der Lokalisation von PceB in der Cytoplasmamembran von *D. hafniense* Y51 war der Anstoß für die Untersuchung der Funktion des Proteins als Membrananker für die PCE-Dehalogenase (PceA). Dies wurde im Rahmen von *in vitro*-Interaktionsstudien mit Hilfe von Far Western Blot-Analysen untersucht. Eine Isolierung und Reinigung von nativen bzw. rekombinanten PceB-Protein in ausreichenden Mengen war nicht möglich, weshalb die direkte Interaktion von PceA und PceB z. B. mittels Gel-Shift-Experimenten nicht untersucht werden konnte. Eine Untersuchung der Interaktion mittels des Yeast Two-Hybrid- oder des Bacterial Two-Hybrid-Systems wurde als nicht sinnvoll erachtet, da in den dafür verwendeten Hefe- und Bakterienstämmen keine Corrinoide-Biosynthese erfolgt und damit die Bildung von funktionsfähiger PCE-Dehalogenase ausgeschlossen



werden kann.

Die Strukturvorhersage von PceB ergab 3 potentielle Bindungsstellen für PceA (Abb. 3-27). Dabei handelt es sich um den cytoplasmatischen und den exoplasmatischen Loop sowie den C-Terminus des Proteins. Um deren Bindungsfähigkeit für PceA zu untersuchen, wurden für diese drei Abschnitte des Proteins synthetische Peptide erzeugt. Die Peptide wurden auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und die Bindung der Peptide mittels PonceauS-Färbung kontrolliert (Abb. 3-31 B1). Die Peptidlösung P2 war granulär und konnte deshalb punktuell aufgetragen werden, was in einer hohen Intensität der PonceauS-Färbung resultierte. Die Peptidlösungen P1 und P3 waren hingegen homogener, sodass sich diese Peptide auf der Membran stärker verteilten. Folglich war die PonceauS-Färbung hier etwas schwächer. Dennoch wurden alle Peptide durch PonceauS deutlich angefärbt, sodass eine Beeinflussung des Experiments durch die unterschiedlichen Qualitäten der Peptide keine Rolle spielen sollte. Im nächsten Schritt wurden die Peptide mit PceA-haltigem Rohextrakt aus Zellen von *D. hafniense* Y51 inkubiert und die Bindung von PceA mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Zum Ausschluss einer möglichen Kreuzreaktion der primären bzw. sekundären Antikörper mit den Peptiden wurden verschiedene Kontrollexperimente durchgeführt (Abb. 3-31 B2 – B4). In diesen konnten keine bzw. nur schwache Interaktionen mit den Peptiden beobachtet werden. Im Rahmen der Interaktionsexperimente wurde in *D. hafniense* Y51 der exoplasmatische Loop als potentielle Bindungsstelle für PceA identifiziert (Abb. 3-31 A, B5). Eine Interaktion von PceA mit dem cytoplasmatischen Loop bzw. dem C-Terminus des PceB-Proteins konnte nicht detektiert werden.

Die exoplasmatischen Loops der RdhB-Proteine weisen deutliche Homologien bezüglich ihrer Aminosäuresequenz auf (Abb. 3-28 B). Dies führte zu der Vermutung, dass eine Interaktion von RdhA und RdhB aus verschiedenen Mikroorganismen möglich sein könnte. Zur Untersuchung einer solchen Interaktion zwischen PceA aus *D. hafniense* Y51 und PceB aus *S. multivorans* wurde ein Far Western Blot-Experiment mit synthetischen Peptiden gegen den exoplasmatischen Loop (P1<sub>exo</sub>) und den cytoplasmatischen C-Terminus (P2<sub>cyto</sub>) des PceB-Proteins aus *S. multivorans* durchgeführt (Abb. 3-31 A). Es wurde jedoch keine signifikante Bindung von PceA aus *D. hafniense* Y51 an diese Peptide detektiert.



**Abbildung 3-31:** Far Western Blot-Analyse zur Untersuchung der *in vitro* Interaktion von PceA aus *D. hafniense* Y51 und synthetischen Peptiden (P) des PceB-Proteins. Die Detektion von gebundenem PceA-Protein erfolgte mit spezifischen Antikörpern. Als Kontrolle diente PceA-haltiger Rohextrakt von *D. hafniense* Y51. Die Zellen wurden in Anwesenheit von PCE kultiviert. **(A)** Interaktion von PceA mit synthetischen PceB-Peptiden aus *D. hafniense* Y51 bzw. *S. multivorans*. Es wurden jeweils 0,5 bis 5 µg jedes Peptids aufgetragen. **(B)** Interaktion von PceA mit den Loops des PceB Proteins und den modifizierten Peptiden des exoplasmatischen Loops aus *D. hafniense* Y51. Von den Peptiden bzw. dem Rohextrakt wurden jeweils 5 µg aufgetragen. exo - exoplasmatisch, cyto - cytoplasmatisch. A - Alanin, E - Glutaminsäure, Q - Glutamin, S - Serin.

Die meisten RdhB-Proteine besitzen einen exoplasmatischen Loop des Typs 1 (Abb. 3-28 B), welcher durch 2 stark konservierte Glutaminsäure-Reste (-xExEx-) gekennzeichnet ist (Abb. 3-28 B; Typ 1). Innerhalb der Gattung *Desulfitobacterium* spec., aber auch bei *Sulfurospirillum* spec. oder *Dehalobacter* spec., findet man zudem einen stark konservierten

Serin- und Glutaminrest, sodass folgende Konsensussequenz angegeben werden kann: xSxxExExQx. Auf Grund der Konservierung dieser Aminosäuren wurde angenommen, dass diese eine essentielle Rolle bei der Bindung von PceA spielen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden modifizierte Peptide des exoplasmatischen Loops hergestellt, in welchen jeweils einer der betreffenden Aminosäurereste gegen Alanin ausgetauscht wurde. Diese Peptide werden im Weiteren als P2<sub>S58A</sub>, P2<sub>E61A</sub>, P2<sub>E63A</sub> bzw. P2<sub>Q65A</sub> bezeichnet (Abb. 3-31 B). Hierbei gibt die Zahl die Position des Aminosäurerestes im Protein an.

Der Nachweis von PceA mittels PceA-spezifischen Antikörpern zeigte eine zum nicht-mutierten Peptid vergleichbare Signalstärke mit den Peptiden P2<sub>S58A</sub> und P2<sub>E61A</sub> (Abb. 3-31 B5). Bei den Peptiden P2<sub>E63A</sub> und P2<sub>Q65A</sub> konnte hingegen kein gebundenes PceA mehr nachgewiesen werden. Ein Problem bei diesen Experimenten war die Bindungsfähigkeit der Peptide an die Membran. Während das Peptid P2<sub>S58A</sub> sich wie der exoplasmatische Loop des Wildtyps (P2<sub>exo</sub>) mit PonceauS anfärben ließ, konnten die anderen Peptide nur schlecht nachgewiesen werden. Somit kann eine Beeinflussung des Experiments durch die unterschiedliche Bindung der Peptide nicht ausgeschlossen werden. Einzig für die Peptide P2<sub>S58A</sub> und P2<sub>E61A</sub> konnte eindeutig gezeigt werden, dass der Austausch gegen Alanin offensichtlich keinen Einfluss auf die Bindung von PceA hat. Die beobachtete Färbung konnte eindeutig auf die Bindung von PceA zurückgeführt werden. Kreuzreaktionen mit dem primären bzw. sekundären Antikörper waren von geringem Ausmaß (Abb. 3-31 B2-4).

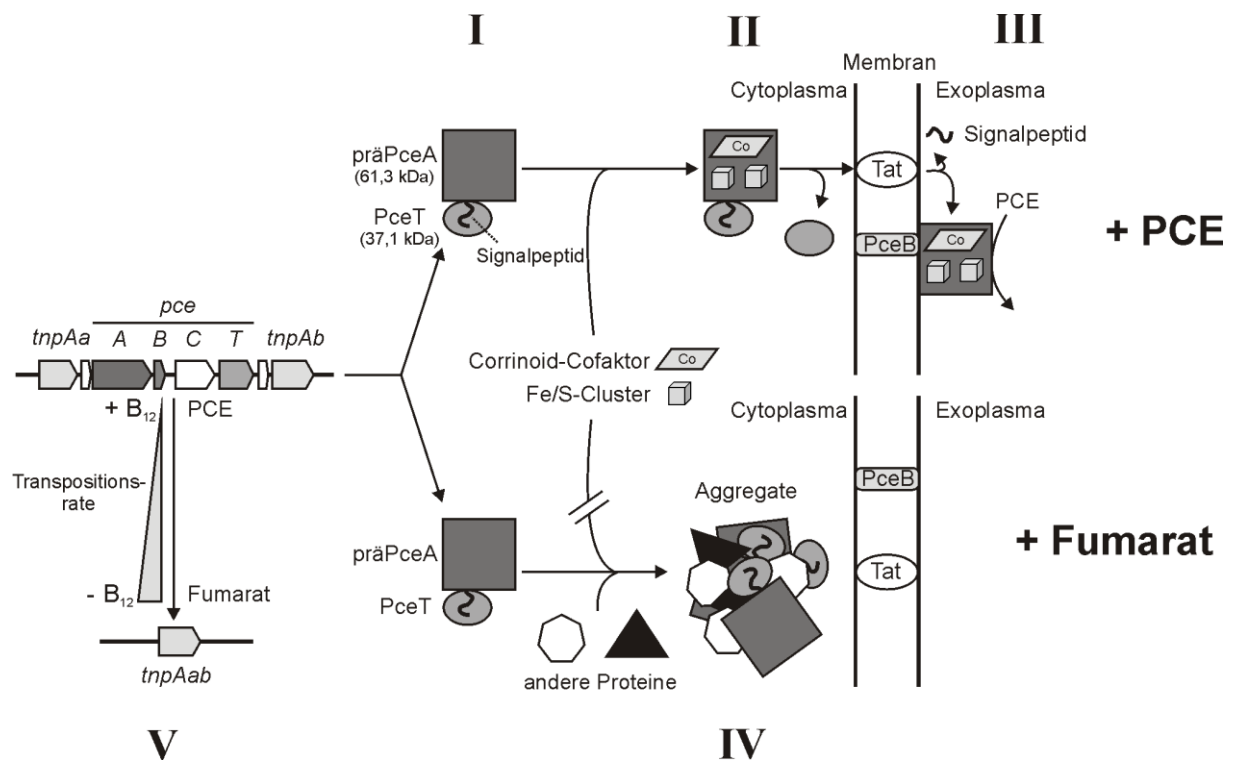
Zur Absicherung der erhaltenen Daten wurde die Interaktion von PceA und PceB mittels Peptidarray-Analyse, einer Variante des Far Western Blots, untersucht. Bei dieser Methode wurde ein Peptid-Scan von PceB auf einer Zellulosemembran erzeugt. Dafür wurden jeweils Peptide mit einer Länge von 15 Aminosäuren synthetisiert. Die Peptide überlappten einander und wiesen jeweils eine Verschiebung der Peptidsequenz um eine Position in Richtung C-Terminus auf. Die Scans wurden anschließend, wie für die Far Western Blot-Analysen beschrieben, mit Rohextrakt von *D. hafniense* Y51 inkubiert. Um die Bedeutung anderer Proteine für die Interaktion von PceA und PceB einschätzen zu können, wurde auch gereinigtes PceA-Protein (zur Verfügung gestellt von Cindy Kunze) verwendet. Im Anschluss wurde gebundenes PceA wiederum mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. In allen Fällen konnte jedoch keine Interaktion mit dem exoplasmatischen Loop des PceB-Proteins beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

## 4. Diskussion

Die Belastung von Böden und des Grundwasser mit halogenierten, vor allem chlorierten Verbindungen, ist ein globales Problem. Zur Lösung dieses Problems werden unter anderem Bioreaktoren verwendet, in denen das mit halogenierten Verbindungen kontaminierte Wasser über ein festes, mit Mikroorganismen inokuliertes Trägermaterial geleitet wird. Die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften zeigte, dass vorwiegend Bakterien, aber auch Archaea vorkommen (Juteau et al. 1995, Lanthier et al. 2005, Puyol et al. 2011). In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedenste Bioreaktoren beschrieben und deren mikrobiellen Gemeinschaften analysiert. Für den Abbau der chlorierten Verbindungen (z. B. Tetrachlorethen, 3-Chlorbenzoat, Pentachlorphenol, 2,4,6-Trichlorphenol) werden unter anderem dehalogenierende Bakterien, wie z. B. *Desulfomonile tiedjei*, *Sulfurospirillum multivorans*, aber auch verschiedene *Desulfitobacterium hafniense* Stämme, wie z. B. DCB-2 oder PCP-1, verwendet (Ahring et al. 1992, Christiansen et al. 1996, Hörber et al. 1998, Tartakowsky et al. 1999, Lanthier et al. 2005, Puyol et al. 2011). Diese Beispiele weisen auf die Bedeutung der Gattung *Desulfitobacterium spec.* für die Bioremediation von mit halogenierten Verbindungen belasteten Standorten hin. Um die Effizienz der reduktiven Dechlorierung in den Bioreaktoren zu verbessern, ist das Verständnis, der dem Prozess zugrunde liegenden Mechanismen und deren Steuerung von essentieller Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die reduktive Dechlorierung von Tetrachlorethen (PCE) in *D. hafniense* Y51 untersucht. Von besonderem Interesse war dabei der Einfluss von PCE und externem Corrinoid auf die Expression der *pce*-Gene sowie auf die Bildung und Funktion der PCE-Dehalogenase (PceA). Des Weiteren sollte die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von PceB, dem mutmaßlichen Membrananker-Protein für PceA, und des mutmaßlichen Faltungshelfers PceT Aufschluss über den Lebenszyklus des PceA-Proteins und der an der Synthese bzw. Funktion von PceA beteiligten Proteine geben. Eine Untersuchung der Lokalisation des mutmaßlichen membran-integralen PceC-Proteins war bisher auf Grund des Mangels eines spezifischen Antikörpers nicht möglich.

Die bis heute verfügbaren Daten über die Interaktion von PceA und PceT (Morita et al. 2009, Maillard et al. 2011), die Studien zur Lokalisation der PCE-Dehalogenase (Reinhold 2008) und die Ergebnisse dieser Doktorarbeit können in einem Modell zusammengefasst werden, das im Folgenden erläutert wird (Abb. 4-1).



**Abbildung 4-1:** Modell der Bildung und Reifung der PCE-Dehalogenase (PceA) in *D. hafniense* Y51 in Abhängigkeit von Vitamin B<sub>12</sub> (Cyanocobalamin) und terminalen Elektronenakzeptoren.

#### **Kultivierung von *D. hafniense* Y51 in Anwesenheit von PCE**

Die Anwesenheit von PCE führte zu einer kontinuierlichen Bildung einer funktionsfähigen PCE-Dehalogenase in *D. hafniense* Y51 (Abb. 4-1 I - III; Reinhold 2008). Eine Beeinflussung der PceA-Aktivität oder der gebildeten Menge an PceA durch Zugabe von externem Vitamin B<sub>12</sub> bestand nicht (Abb. 3-15).

Im Anschluss an die Translation der mRNA wird die entstehende PceA-Peptidkette durch das Chaperon PceT gebunden (Abb. 4-1 I; Morita et al. 2009, Maillard et al. 2011). Die Bindung erfolgt direkt am Signalpeptid von PceA (Maillard et al. 2011). Diese Interaktion verhindert die Translokation des ungefalteten und nicht vollständig assemblierten PceA-Proteins durch Blockade der charakteristischen Erkennungssequenz RRxFxK des Tat-Systems. Letzteres System dient dem Transport vollständig gefalteter meist Cofaktor-haltiger Proteine über die Cytoplasmamembran (Berks et al. 2000). Der Einbau aller Cofaktoren ist vermutlich Voraussetzung für den Transport. So wurde gezeigt, dass ein Transport der Trimethylamin-N-Oxid (TMAO)-Reduktase aus *Escherichia coli* nur nach erfolgreichem Cofaktor-Einbau erfolgt (Santini et al. 1998). Für den Transport von PceA in das Exoplasma der Zellen ist vermutlich der Einbau des Corrino-Cofaktors und der zwei Eisen/Schwefel-Cluster Voraussetzung. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde für PceT in *D. hafniense* Y51

eine cytoplasmatisch, häufig membran-assoziierte Lokalisation beobachtet (Abb. 3-3). Dies lässt vermuten, dass PceT möglicherweise den Transport von präPceA zur Translokationspore des Tat-Apparates vermittelt. Da PceT nur in geringen, nicht signifikanten Mengen im Exoplasma der Zellen nachweisbar war, ist zudem anzunehmen, dass sich PceT vor dem Transport des vollständig gefalteten PceA-Proteins vom Signalpeptid löst und im Cytoplasma der Zellen verbleibt (Abb. 3-3; Abb. 4-1 II). Was im Anschluss mit dem freien PceT-Protein geschieht ist unbekannt. Möglicherweise bindet es an weiteres präPceA-Protein oder es erfolgt der Abbau.

Im Exoplasma der Zellen wies die gereifte PCE-Dehalogenase eine membran-assoziierte Lokalisation auf, was deren Nachweis per Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie (FRIL) ermöglichte (Abb. 4-1 III). Es ist anzunehmen, dass für den Transfer der Elektronen vom Elektronendonator Pyruvat auf die PCE-Dehalogenase eine Bindung von PceA an die Membran notwendig ist, da die Oxidation von Pyruvat möglicherweise durch eine Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (DSY0115, DSY4888) im Cytoplasma der Zellen erfolgt. Die frei werdenden Elektronen werden anschließend vermutlich auf ein Ferredoxin übertragen, jedoch ist der weitere Elektronentransfer bis zu PceA unbekannt (Nonaka et al. 2006, Peng et al. 2012). Möglicherweise sind Elektronen-transferierende Flavoproteine (ETF) oder eine NADH-Dehydrogenase (DSY2578-2588) am Elektronentransport beteiligt. Für ein ETF, DSY1629, konnte in Anwesenheit von TCE eine Steigerung der Expression gezeigt werden (Peng et al. 2012). Für die Bindung von PceA an die Membran wurde eine Interaktion mit dem mutmaßlichen Membrananker-Protein PceB angenommen. Das PceB-Protein aus *D. hafniense* Y51 ist das erste mutmaßliche Membrananker-Protein einer reduktiven Dehalogenase, für das eine Bildung *in vivo* gezeigt werden konnte (Abb. 3-29). Die vorhergesagte Struktur von PceB mit drei transmembranen Helices und die membran-assoziierte Lokalisation des Proteins unterstützen die vermutete membran-integrale Lokalisation von PceB. Die Analyse von RdhB-Proteinen, mutmaßliche Membrananker-Proteine, verschiedener dehalogenierender Mikroorganismen und die beobachtete starke Konservierung der Aminosäuresequenz der exoplasmatischen Loops legten die Vermutung nahe, dass die Interaktion von RdhA und RdhB vor allem in diesem Bereich stattfindet. Die durchgeführten Far Western Blot-Experimente zeigten eine solche Interaktion zwischen dem exoplasmatischen Loop von PceB und PceA. Bis zum jetzigen Zeitpunkt basierten die Untersuchungen zur Interaktion von PceA und PceB auf indirekten Methoden. Derzeit ist es nicht möglich PceB in ausreichenden Mengen aus Zellen von *D. hafniense* Y51 zu isolieren bzw. heterolog in *Escherichia coli* zu exprimieren, um die direkte Interaktion z. B. mittels der sehr sensitiven Biacore-Technologie zu untersuchen. Versuche mit PceB aus *S. multivorans*

zeigten, dass eine heterologe Expression des Proteins in *E. coli* zum Absterben der Zellen vermutlich durch übermäßige Integration des Proteins in die Cytoplasmamembran mit nachfolgender Lyse der Zellen führt. Um die Löslichkeit des exprimierten PceB-Proteins zu erhöhen wurde dieses mit dem Maltose-Bindeprotein (MBP) fusioniert. Jedoch führte die anschließende Abspaltung von MBP zur Aggregation des stark hydrophoben PceB-Proteins.

### ***Kultivierung mit Fumarat als alternativen terminalen Elektronenakzeptor***

Bei Kultivierung von *D. hafniense* Y51 mit Pyruvat als Elektronendonator und Fumarat als terminalen Elektronenakzeptor übernimmt die Fumaratreduktase die Funktion der PCE-Dehalogenase - den Elektronentransfer auf den terminalen Elektronenakzeptor. Untersuchungen zeigten, dass bei Subkultivierung in Anwesenheit von Fumarat zunächst weiterhin die Bildung der PCE-Dehalogenase erfolgt (Reinhold 2008). Jedoch kommt es zur Aggregation des Enzyms im Cytoplasma der Zellen auf Grund der unvollständigen Reifung von PceA. Die Aggregation von präPceA (Abb. 4-1 IV) wurde zunächst nur nach 15 Subkulturen in Anwesenheit von Fumarat beobachtet (mit externem Vitamin B<sub>12</sub>; Reinhold 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass der Aggregationsprozess bereits nach einer einzigen Subkultur ohne Enzymsubstrat beginnt.

Es wurde vermutet, dass der Reifungsprozess von PceA aufgrund des Mangels an Corrinoide-Cofaktor auf Stufe von präPceA stoppt. Dafür spricht der Nachweis der präPceA-Form, sowie des mutmaßlichen Faltungshelfers PceT und des an der Corrinoidebiosynthese beteiligten Proteins CobT in den Aggregaten. PceT besitzt Ähnlichkeiten zu dem Ribosomen-gebundenen Trigger-Faktor (TF)-Chaperon aus *Escherichia coli* (Morita et al. 2009) und bindet die entstehende PceA-Peptidkette vermutlich sofort nach deren Synthese im Bereich des Signalpeptids (Maillard et al. 2011). Auf diese Weise hält PceT präPceA in einer offenen Konformation für den Einbau der Eisen/Schwefel-Cluster und des Corrinoide-Cofaktors. Hierfür spricht die Anwesenheit des an der Synthese des unteren Liganden des Corrinoide beteiligten Proteins CobT. Möglicherweise existiert auch eine Interaktion von präPceA oder dem Chaperon PceT mit weiteren Proteinen des anaeroben Corrinoide-Biosyntheseweges (Warren et al. 2002, Claas et al. 2010). Für PceT wurde zwar beschrieben, dass die Bindung an PceA die Löslichkeit heterolog exprimierter PCE-Dehalogenase erhöht (Maillard et al. 2011), möglicherweise wird die Aggregation von PceA in *D. hafniense* Y51 aber durch andere Proteine gefördert.

Die Abwesenheit von Proteinaggregaten in der LD-Variante von *D. hafniense* Y51, welche keinen *pceABCT*-Gencluster besitzt, zeigte, dass der Prozess der Aggregation

vermutlich durch die Anwesenheit von ungefaltetem PceA-Protein ausgelöst wird. Allgemeine Untersuchungen zur Aggregation von Proteinen bestätigen, dass solche ungefalteten Proteinvorstufen zur Aggregation neigen (Fink 1998). Die Anwesenheit von Proteinen des Translationsapparates der Zelle (z. B. Elongationsfaktor G, Elongationsfaktor Tu, ribosomale Proteine, RNA-Polymerasen) in den Aggregaten sind ein weiteres Indiz dafür, dass es bereits während oder direkt im Anschluss an die Translation der mRNA zu einer Aggregation der entstehenden PceA-Peptidketten kommt. Vor allem die Anwesenheit des Elongationsfaktors Tu unterstützt diese Annahme (Ramakrishnan 2002).

Die Bildung von präPceA-Aggregaten muss nicht zwangsläufig das Ende der PceA-Biosynthese bedeuten. Eine Re-Solubilisierung von aggregierten Proteine kann zum Beispiel durch ein Bi-Chaperonsystem, bestehend aus ClpB und DnaK erfolgen (Schlieker et al. 2002). Das Protein ClpB gehört zur Gruppe der AAA<sup>+</sup>-Proteine (Hsp104), die am Abbau falsch gefalteter Proteine beteiligt sind (für Review siehe Mogk et al. 2008). In Kooperation mit Proteinen des Hsp70-Systems wie DnaK kann eine Auflösung von Proteinaggregaten und Reassemblierung der enthaltenen Proteine erfolgen (Glover et al. 1998, Zolkiewski 1999, Ben-Zvi et al. 2001). Die kodierenden Gene der notwendigen Proteine lassen sich auch im Genom von *D. hafniense* Y51 nachweisen (z.B. *clpB* - DSY 1668, *dnaK* - DSY 3130). Die Bildung dieser und deren Beteiligung an einer möglichen Re-Solubilisierung der PceA-Aggregate muss noch gezeigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch bereits beobachtet werden, dass die Zugabe von PCE innerhalb von 1 bis 2 Subkulturen zu einer Verringerung der Aggregatgröße führt. Alle Daten deuten daraufhin, dass die PceA-Aggregate eine Art Reservoir-Funktion übernehmen. Ob eine Umwandlung der in den Aggregaten vorhandenen Vorläuferform der PCE-Dehalogenase in aktives Protein erfolgt, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Es wurden keine Hinweise dafür gefunden, dass es innerhalb der Aggregate zu einer Proteolyse der PceA-Proteine kommt. Die Analyse der Aggregate im Immunoblot zeigte keine PceA-Abbauprodukte (Abb. 3-6 E).

### ***Der Corrinoïd-Cofaktor der PCE-Dehalogenase***

Die Bedeutung des Corrinoïd-Cofaktors für die Biosynthese von funktionellem PceA-Protein zeigte sich an der Bildung von PceA-Aggregaten im Cytoplasma der Zellen von *D. hafniense* Y51. Der Mangel an Corrinoïd-Cofaktor, der allen Resultaten nach der Auslöser für die Aggregation der PCE-Dehalogenase ist, konnte nicht durch Zugabe von externem Vitamin B<sub>12</sub> ausgeglichen werden. Eine Aufnahme von Cyanocobalamin in die Zellen ist möglich (Abb. 3-10) und erfolgt vermutlich über das BtuFCD-Transportsystem, für welches bereits in



*E. coli* die Corrinoide-Aufnahme in die Zelle gezeigt werden konnte (Borths et al. 2002, Cadieux et al. 2002, Borths et al. 2005). Offensichtlich kann Cyanocobalamin aber nicht direkt als Cofaktor verwendet werden, sondern muss womöglich vor dem Einbau in PceA modifiziert und der oberer Ligand, die Cyanogruppe, gegen die natürlich vorkommende Adenosylgruppe ausgetauscht werden. Vorläufige Untersuchungen an Aggregat-haltigen Zellen zeigten, dass Adenosylcobalamin einen möglichen Corrinoide-Cofaktor von PceA darstellen könnte. Wurde nach 15 Subkulturen während der Kultivierung von *D. hafniense* Y51 in Abwesenheit von PCE (LZK1) das Cyanocobalamin im Medium gegen Adenosylcobalamin ausgetauscht, so konnte eine Steigerung der dechlorierenden Aktivität der Aggregat-haltigen Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Der Austausch des oberen Liganden wird durch die ATP:Co(I)rrinoide-Adenosyltransferase (CobA; DSY4059; Abb. 1-4) katalysiert (Escalante-Semerena 2007). Die vorläufige Analyse der Expressionslevel der Corrinoide-Biosynthesegene in Abwesenheit des Enzymsubstrates PCE weisen auf eine starke Reduktion der Transkriptlevel der Gene hin, was im Laufe der Subkultivierung in einem Mangel an CobA resultieren würde (Abb. 3-14). Dieser CobA-Mangel wäre eine Erklärung dafür, dass keine Modifikation des Cyanocobalamin und Einbau in PceA erfolgen kann.

Die Kultivierung von *D. hafniense* Y51 ohne externes Vitamin B<sub>12</sub> zeigte, dass eine *de novo* Biosynthese des Corrinoide-Cofaktors möglich ist. Dies wurde bereits durch Analyse des Genoms von *D. hafniense* Y51 vermutet (Nonaka et al. 2006) und hier nun erstmals gezeigt (Abb. 3-10). Die Bildung von PceA-Aggregaten bei Kultivierung von *D. hafniense* Y51 in Anwesenheit von PCE ohne externes Vitamin B<sub>12</sub> deutet an, dass die *de novo* Corrinoide-Biosynthese nicht ausreicht um alle PceA-Moleküle mit Corrinoide-Cofaktor zu versorgen. Vermutlich sind die Zellen auf die Zugabe eines zusätzlichen externen Corrinoide oder einer Zwischenstufe der Biosynthese angewiesen. Dies ist nicht ungewöhnlich. Für das dechlorierende Bakterium *Dehalococcoides mccartyi* Stamm 195 wurde sogar gezeigt dass die Zugabe von Cyanocobalamin für die Dehalogenierung chlorierter Verbindungen und das Wachstum obligat ist (He et al. 2007, Yi et al. 2012). Für dieses Bakterium wurde zudem gezeigt, dass eine Aufnahme von externem Corrinoide in die Zellen erfolgt und nicht nutzbare Corrinoide in Anwesenheit einer funktionellen Benzimidazolbase umgewandelt werden können, sodass diese als Cofaktor der Dehalogenase verwendet werden können (Yi et al. 2012).

Die *de novo* Corrinoide-Biosynthese in *D. hafniense* Y51 führte zur Bildung eines unbekannten Corrinoide (Abb. 3-10 B). Eine Identifizierung dieses Corrinoide im Rahmen der HPLC-Analytik durch den Vergleich der Retentionszeiten mit denen der verwendeten Standards war nicht erfolgreich. Eine exakte Identifizierung ist folglich nur durch eine

Strukturanalyse mittels LC-MS oder  $^1\text{H}$ -NMR möglich, was im Moment in weiterführenden Untersuchungen in Kooperation mit Dr. Bernhard Kräutler (Universität Innsbruck, Österreich) erfolgt. Die alleinige Zugabe des unteren Liganden von Vitamin B<sub>12</sub>, Dimethylbenzimidazol (DMB), zu Zellen von *D. hafniense* Y51 führte ausschließlich zur Bildung eines DMB-haltigen Corrinooids, welches als Cyanocobalamin aus den Zellen extrahiert werden konnte (Abb. 3-11 B). Unter diesen Bedingungen konnte das zelleigene *de novo* gebildete Corrinooid nicht mehr nachgewiesen werden. Diese Daten deuten an, dass in *D. hafniense* Y51 ein Corrinooid gebildet wird, welches das Grundgerüst von Vitamin B<sub>12</sub> besitzt, der untere Ligand jedoch variieren kann. Auf Grund der Retentionszeiten der isolierten Corrinoide konnte ausgeschlossen werden, dass Adenin als unterer Ligand genutzt wird, wie dies in *S. multivorans* der Fall ist (Kräutler et al. 2003). Da die Aktivität der PCE-Dehalogenase nicht durch die Zugabe von externen Corrinoiden beeinflusst wurde, scheint es als können mehrere Corrinoide als Cofaktoren für PceA genutzt werden. Die Verwendung mehrerer verschiedener Corrinoide als Cofaktoren der PCE-Dehalogenase konnte ebenfalls für den nah verwandten Stamm PCE-S gezeigt werden (Siebert 2002).

### ***Regulation oder Transposition ?***

Eine zentrale Frage der Untersuchungen war die transkriptionelle Regulation der reduktiven Dechlorierung von PCE in *D. hafniense* Y51. Das mutmaßliche membran-integrale PceC-Protein weist Sequenzhomologien zu Transkriptionsregulatoren des NirI/NosR-Typs auf (Saunders et al. 1999, Wunsch et al. 2005) und könnte eine Rolle bei der Regulation der reduktiven Dechlorierung spielen. Der Nachweis der Bildung von PceC und die Aufklärung dessen tatsächlicher Funktion in *D. hafniense* Y51 bieten einen Ansatzpunkt für weiterführende Untersuchung, zumal seit kurzem ein Antikörper für Studien der subzellulären Lokalisation zur Verfügung steht (Taiki Futagami, persönliche Mitteilung).

Die Bedeutung der Transposition des *pce*-Genclusters (Abb. 4-4 V) zeigte sich bei kontinuierlicher Kultivierung von *D. hafniense* Y51 in Abwesenheit des Enzymsubstrates PCE. Wurden nach 60 Subkulturen 10 Klone isoliert und auf ihre PceA-Aktivität hin untersucht, so wiesen 7 von 10 einen kompletten Verlust der dechlorierenden Aktivität auf (Tab. 3-3). Wie im Falle der „Large Deletion“ (LD)-Variante (Futagami et al. 2006) beruhte dieser auf einem kompletten Verlust des *pce*-Genclusters. Die Entstehung der „Short Deletion“ (SD)-Variante des Stammes (Futagami et al. 2006), welche auf dem Verlust des Promotorbereiches des *pceABCT*-Genclusters beruht, wurde hier nicht beobachtet. Zu bedenken ist, dass lediglich 10 Klone von *D. hafniense* Y51 isoliert und untersucht wurden,

was eine statistische Auswertung nicht ermöglicht. Durch Futagami et al. (2006) wurden insgesamt 18 Klone von *D. hafniense* Y51 untersucht, wobei ca. 70% der Zellen einen kompletten Verlust des *pce*-Genclusters aufwiesen. Der Verlust des Promotorbereiches wurde bei circa 10% der Zellen beobachtet. Beide Ergebnisse zeigen, dass wesentlich häufiger LD- als SD-Varianten entstehen. Möglicherweise stellt die Transposition des gesamten *pce*-Genclusters ein natürliches Ereignis darstellt, um einen eventuellen Gentransfer vorzubereiten. Dafür spricht auch der Nachweis von zirkulären, die *pceABCT*-Gene enthaltenden Intermediaten in *D. hafniense* Y51 und TCE-1 (Maillard et al. 2005, Futagami et al. 2006)

Die Entstehung von nicht-dechlorierenden Varianten durch Transposition des *pce*-Genclusters führte zur Co-Existenz von dechlorierenden und nicht-dechlorierenden *D. hafniense* Y51-Varianten innerhalb der Kulturen. Die nicht-dechlorierenden Varianten besitzen bei Kultivierung mit Pyruvat als Elektronendonator und PCE als Elektronenakzeptor einen erheblichen Wachstumsnachteil gegenüber den dechlorierenden Varianten. Grund hierfür ist die sehr langsame Verwertung von Pyruvat ohne terminalen Elektronenakzeptor, die sich über mehrere Tage erstreckt (Reinhold 2008). Folglich setzen sich die dechlorierenden Varianten durch, was das konstant hohe *pceA*-Gen- und Proteinlevel in den Kulturen erklärt. Die Anwesenheit von PCE übt damit einen positiven Selektionsdruck auf die dechlorierenden Varianten aus. Der Austausch von PCE gegen Fumarat als terminalen Elektronenakzeptor bewirkte meist den vollständigen Verlust des *pce*-Genclusters in den Kulturen von *D. hafniense* Y51, gepaart mit einem Verlust des PceA-Proteins und der PceA-Aktivität. Auch die gleichzeitige Anwesenheit von PCE und Fumarat führte zu diesem Ergebnis (Reinhold 2008). Die Kultivierung in Anwesenheit beider Elektronenakzeptoren zeigt, dass PCE bei Präsenz eines weiteren nutzbaren Elektronenakzeptors nicht ausreicht, um den Selektionsdruck auf dechlorierende Varianten aufrechtzuerhalten. Offensichtlich ist die Nutzung von Fumarat im Rahmen der Fumarat-Atmung für den Stoffwechsel und das Wachstum von *D. hafniense* Y51 wesentlich günstiger als die Dechlorierung von PCE, was Fumarat-verwertenden Zellen einen Wachstumsvorteil verleiht.

Eine entscheidende Rolle bei der Transposition des *pce*-Genclusters spielt die Anwesenheit von Cyanocobalamin (Vitamin B<sub>12</sub>) im Medium (Abb. 4-1 V). Untersuchungen durch Futagami et al. (2006) zeigten, dass es bei Kultivierung von *D. hafniense* Y51 in Abwesenheit von PCE und ohne externes Vitamin B<sub>12</sub> zu einem schnellen Rückgang des *pceA*-Genlevels innerhalb weniger Subkulturen kommt. Die Kultivierung von *D. hafniense* Y51 mit einer externen Vitamin B<sub>12</sub>-Konzentration von 250 µg/l (~ 160 nM) führte hingegen zu einem langsamen Rückgang des PceA-Proteins innerhalb von 30 Subkulturen (Duret et al.

2012). Ein vergleichbar langsamer Rückgang des PceA-Proteins konnte bei Subkultivierung von *D. hafniense* Y51 in Abwesenheit von PCE mit einer externen Vitamin B<sub>12</sub>-Menge von 30 nM beobachtet werden (Reinhold 2008). Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigten erstmals, dass externes Vitamin B<sub>12</sub> einen positiven Einfluss auf die Stabilität des *pce*-Genclusters hat (Abb. 4-1 V), die Transposition des Genclusters verzögert und damit die Biosynthese des PceA-Proteins beeinflusst. Für einen signifikanten Effekt sind bereits geringe Mengen von 0,3 nM ausreichend. Damit können die eben beschriebenen Unterschiede bei den Kultivierungen von *D. hafniense* Y51 in Abwesenheit von PCE durch den Einfluss von Vitamin B<sub>12</sub> (Cyanocobalamin) erklärt werden. Ungeklärt bleibt, welcher molekulare Mechanismus sich hinter der Verzögerung der Transposition verbirgt. Möglicherweise hat Cyanocobalamin einen direkten oder indirekten positiven Einfluss auf die Expression des *pce*-Genclusters, wodurch die Transposition verzögert wird.

Offen bleibt außerdem welche Bedeutung den Riboswitch-Elementen zukommt, die stromaufwärts der Gencluster für die Corrino-Biosynthese und des *btuFCD*-Genclusters identifiziert wurden (Abb. 1-4). Einen Hinweis auf deren Funktionalität in *D. hafniense* Y51 konnte durch die Zugabe von Adenosylcobalamin zu den PCE-gewachsenen Zellen erhalten werden. In diesem Fall kam es zu einer Reduzierung der Menge des zelleigenen *de novo* synthetisierten Corrino (Abb. 3-11 B) während ein großer Anteil eines DMB-haltigen Corrino, welches aus dem Adenosylcobalamin im Medium gebildet wurde, nachgewiesen werden konnte. Diese Reduzierung des zelleigenen *de novo* synthetisierten Corrino kann durch eine mögliche Interaktion des Adenosylcobalamins mit den Riboswitchen erklärt werden, was eine sinkende Expression der Corrino-Biosynthesegene zur Folge hätte. Dass Adenosylcobalamin durch Bindung an Riboswitch-Elemente die Genexpression beeinflussen kann, wurde bereits anhand des BtuB-Proteins aus *Escherichia coli* gezeigt (Nahvi et al. 2002, Gallo et al. 2008).

Der in Anwesenheit von Vitamin B<sub>12</sub> beobachtete langsame Rückgang des PceA-Proteins und der damit verbundene Verlust der dechlorierenden Aktivität in Abwesenheit von PCE, konnte ebenfalls bei *S. multivorans* beobachtet werden (John et al. 2009). Hier wurde gezeigt, dass die Abwesenheit von PCE zu einer Verringerung bzw. den kompletten Verlust des *pceAB*-Transkripts führt. Es wurde ausgeschlossen, dass der Rückgang des *pceA*-Transkripts auf dem Funktionsverlustes des *pceA*-Gens beruht, da eine Induktion der Dechlorierung von PCE wieder möglich war (Rakoczy 2007). Zudem befindet sich der kodierende *pce*-Gencluster, bestehend aus *pceA* und *pceB*, nicht auf einem Transposon. Somit kann bei *S. multivorans* tatsächlich von einer transkriptionellen Regulation der Organohalid-Respiration gesprochen werden.

Die Abwesenheit von externem Vitamin B<sub>12</sub> beeinflusste neben der Transposition des *pce*-Genclusters ebenfalls die Morphologie der Zellen und führte bei gleichzeitiger Abwesenheit von PCE zu einem filamentösen Phänotyp von *D. hafniense* Y51. Die Bedeutung von Vitamin B<sub>12</sub> für die Zellteilung wurde bereits bei *Lactobacillus leichmanii* beobachtet (Deibel et al. 1956). Durch den Mangel an Vitamin B<sub>12</sub> im Medium wurde hier ebenfalls filamentöses Wachstum ausgelöst. Für menschliche Zellen ist bekannt, dass der Mangel an Vitamin B<sub>12</sub> durch Inaktivierung der B<sub>12</sub>-abhängigen Methionin-Synthase im Endeffekt in einer Störung der DNA-Synthese und Zellteilung resultiert (Scott 1999). Interessanterweise tritt der filamentöse Phänotyp von *D. hafniense* Y51 nur bei gleichzeitiger Abwesenheit von PCE und Vitamin B<sub>12</sub> auf. Möglicherweise hat PCE einen Einfluss auf die Corrino-Biosynthese, was auf einen Zusammenhang von PceA-Biosynthese und Corrino-Biosynthese hindeuten würde.

Für die weitere Untersuchung der reduktiven Dechlorierung in *D. hafniense* Y51 ist entweder die Etablierung eines genetischen Systems oder die Isolierung einer Variante von *D. hafniense* Y51 mit stabil integriertem *pce*-Gencluster notwendig. Ersteres wurde bereits für *Desulfotobacterium dehalogenans* etabliert (Smidt et al. 2000), war aber bisher für *D. hafniense* Y51 nicht erfolgreich (Anita Mac Nelly, persönliche Mitteilung). Die Existenz von dechlorierenden und nicht-dechlorierenden Varianten in Kulturen von *D. hafniense* Y51 bot somit einen interessanten Ansatzpunkt für die Isolierung einer Variante von *D. hafniense* Y51 mit stabil integriertem *pce*-Gencluster. Tatsächlich konnte ein Klon isoliert werden, der nach erneuter Kultivierung in Abwesenheit von PCE für 60 Subkulturen immer noch dechlorierende Aktivität aufwies. Bevor dieser Klon jedoch für Studien zur transkriptionellen Regulation der reduktiven Dechlorierung verwendet werden kann, muss auf molekularbiologischer Ebene die Ursache für die Stabilität des Genclusters gefunden werden. Genetische Veränderungen der Inverted Repeats, den Angriffsstellen der Transposasen, konnten ausgeschlossen werden. Möglicherweise bestehen jedoch genetische Modifikationen im Bereich der Transposasen oder anderen für die Transposition relevanten Systemen. Dies muss im Weiteren durch Sequenzierung dieser Bereiche bzw. des gesamten Genoms untersucht werden.

### **Bedeutung von *D. hafniense* Y51 als reduktiver Dechlorierer**

Der Fakt, dass der *pceABCT*-Gencluster von *D. hafniense* Y51 auf einem Transposon lokalisiert ist, lässt vermuten dass dieser erst im Laufe der Evolution durch horizontalen Gentransfer in die Zellen gelangt ist. Der horizontale Gentransfer stellt einen wichtigen Punkt

in der Evolution bakterieller Genome dar und ermöglicht es Mikroorganismen sich durch Gewinnung neuer Fähigkeiten an ändernde Umweltbedingungen zu adaptieren. Die Analyse von *Dehalococcoides mccartyi* 195 zeigte, dass ca. 20% des Genoms aus Fremd-DNA besteht (Maillard et al. 2005). *D. mccartyi* 195 besitzt insgesamt 18 Gene, die mutmaßliche reduktive Dehalogenasen kodieren. Drei dieser Gene liegen in der Wirts-DNA, die restlichen Gene befinden sich hingegen in Bereichen der Fremd-DNA und sind vermutlich durch horizontalen Gentransfer aufgenommen wurden. Auch die hohen Sequenzidentitäten und der gleiche Aufbau der *pce*-Gencluster von *D. hafniense* Y51, PCE-S und TCE-1, welche auf Transposons liegen, und die des *pce*-Genclusters aus *Dehalobacter restrictus* lassen einen Aufnahme durch horizontalen Gentransfer vermuten (Abb. 1-6; Maillard et al. 2003, Futagami et al. 2008). Ein weiteres Beispiel für den Interspezies-Gentransfer von *pce*-Genen ist *Geobacter lovleyi*, welcher der einzige Organismus der Gattung *Geobacter* ist, der die Fähigkeit zur reduktiven Dechlorierung von PCE bzw. TCE besitzt (Wagner et al. 2012). Der Nachweis des Gentransfers von *pce*-Genen zwischen verschiedenen Mikroorganismen legt die Vermutung nahe, dass noch weitere bisher unbekannte dechlorierende Bakterien existieren.

Die Präsenz des *pce*-Genclusters auf einem mobilen genetischen Element in *D. hafniense* Y51 und der Verlust dieses Genclusters in Abwesenheit des Enzymsubstrates PCE bedingt eine gewisse phänotypische Heterogenität der Kulturen. Bei Verwendung von *D. hafniense* Y51 für die Bioremediation belasteter Standorte oder des Grundwasser muss deshalb unbedingt folgendes berücksichtigt werden: Zum Erhalt der dechlorierenden Fähigkeit der Kultur ist die kontinuierliche Zugabe von PCE obligat, um einen positiven Selektionsdruck auf dechlorierende Varianten auszuüben. In mikrobiellen Gemeinschaften, z. B. in Bioreaktoren, werden häufig mehrere Elektronenakzeptoren verwendet, was jedoch den nicht-dechlorierenden Varianten von *D. hafniense* Y51 ein Wachstumsvorteil verschaffen könnte. Im Allgemeinen und besonders bei Anwesenheit mehrerer Elektronenakzeptoren sollte auf die Zugabe eines externen Corrinoide geachtet werden, da diese wie hier gezeigt werden konnte, die Transposition des *pce*-Gencluster bei vorübergehender Abwesenheit des Enzymsubstrates verzögern kann. Um den Prozess der Bioremediation zu vereinfachen, sollte wenn möglich auf eine konstant dechlorierende Variante des Mikroorganismus zurückgegriffen werden.

## 5. Literatur

- Abrahamsson K, Ekdahl A, Collén J, Pedersén M (1995).** Marine algae - a source of trichloroethylene and perchlorethylene. *Limnol. Oceanogr.* 40: 1321-1326.
- Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ (2004).** Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11: 36-42.
- Abreu-Goodger C, Merino E (2005).** RibEx: a web server for locating riboswitches and other conserved bacterial regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* 33: W690-692.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (1997).** Hazardous Substances Emergency Events Surveillance (HSEES). Division of Health Studies, Epidemiology and Surveillance Branch, Atlanta, USA.
- Ahring BK, Christiansen N, Mathrani I, Hendriksen HV, Macario AJL & Demacario EC (1992).** Introduction of a *de novo* bioremediation ability, aryl reductive dechlorination, into anaerobic granular sludge by inoculation of sludge with *Desulfomonile tiedjei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3677-3682.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipmann DJ (1990).** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechti R, Moretti S, Mostaguir K, , Redaschi N, Rossier G, Xenarios I, Stockinger H (2012).** ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res.* 40: W597-W603.
- BayLfU (2004).** Bayerisches Landesamt für Umweltschutz. Tetrachlorethen (PER), LHKW (Leichtflüchtige Kohlenwasserstoffe).
- Ben-Zvi AP, Goloubinoff P (2001).** Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *J. Struct. Biol.* 135: 84-93.
- Berks BC, Sargent F, Palmer T (2000).** The Tat protein export pathway. *Mol. Microbiol.* 35: 260-274.
- Borths EL, Locher KP, Lee AT, Rees DC (2002).** The structure of *Escherichia coli* BtuF and binding to its cognate ATP binding cassette transporter. *PNAS* 99: 16642-16647.
- Borths EL, Poolman B, Hvorup RN, Locher KP, Rees DC (2005).** *In vitro* functional characterization of BtuCD-F, the *Escherichia coli* ABC transporter for vitamin B<sub>12</sub> uptake. *Biochemistry* 44: 16301-16309.
- Bossert ID, Häggblom MM, Young LY (2003).** Microbial ecology of dehalogenation. In Dehalogenation: Microbial processes and environmental applications. Editiert durch M. M. Häggblom und I. D. Bossert. *Kluwer Academic Publisher*: 33-52.
- Bradford MM (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

- Bradley PM, Chapelle FH (1996).** Anaerobic mineralization of vinyl chloride in Fe(III)-reducing, aquifer sediments. *Environ. Sci. Technol.* 30: 2084-2086.
- Brown RA, Hines R, Cho J, Leahy M. (2006).** Abiotic and biotic pathways in chlorinated solvent natural attenuation. Präsentiert auf der "Fifth International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds". Monterey, CA.
- Breaker RR (2012).** Riboswitches and the RNA world. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4: a003566.
- Cadieux N, Bradbeer C, Reeger-Schneider E, Köster W, Mohanty AK, Wiener MC, Kadner RJ (2002).** Identification of the periplasmic cobalamin-binding protein BtuF of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184: 706-717
- Cheong CG, Escalante-Semerena JC, Rayment I (2001).** Structural investigation of the biosynthesis of alternative lower ligands for cobamides by nicotinate mononucleotide: 5,6-dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase from *Salmonella enterica*. *J. Biol. Chem.* 276: 37612-37620.
- Cichocka D, Nikolausz M, Haest PJ, Nijenhuis I (2010).** Tetrachloroethene conversion to ethene by a *Dehalococcoides*-containing enrichment culture from Bitterfeld. *FEMS Microbiol.* 72: 297-310.
- Christiansen N & Ahring BK (1996).** Introduction of a *de novo* bioremediation activity into anaerobic granular sludge using the dechlorinating bacterium DCB-2. *Antonie Van Leeuwenhoek* 69: 61-66.
- Claas KR, Parrish JR, Maggio-Hall LA, Escalante-Semerena JC (2010).** Functional analysis of the nicotinate mononucleotide: 5,6-Dimethylbenzimidazole Phosphoribosyltransferase (CobT) enzyme, involved in the late steps of coenzyme B<sub>12</sub> biosynthesis in *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* 192: 145-154.
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE (2004).** WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Res.* 14: 1188-1190.
- Deibel RH, Downing M, Niven Jr. CF, Schweigert BS (1956).** Filament formation by *Lactobacillus leichmannii* when desoxyribosides replace vitamin B<sub>12</sub> in the growth medium. *J. Bacteriol.* 71: 255-256.
- de Weerd KA, Suflita JM (1990).** Anaerobic aryl reductive dehalogenation of halobenzoates by cell extracts of *Desulfomonile tiedjei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2999-3005.
- de Wildeman S, Diekert G, van Langenhove H, Verstraete W (2003).** Stereoselective microbial dehalorespiration with vicinal dichlorinated alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5643-5647.
- Dilks K, Rose RW, Hartmann E, Pohlschröder M (2003).** Prokaryotic utilization of the twin-arginine translocation pathway: a genomic survey. *J. Bacteriol.* 185: 1478-1483.
- Dolfing J (2003).** Thermodynamic considerations for dehalogenation. In Dehalogenation: Microbial processes and environmental applications. Editiert durch M. M. Häggblom und I. D. Bossert. *Kluwer Academic Publisher*: 89-114.



- Duret A, Holliger C, Maillard J (2012).** The physiological opportunism of *Desulfitobacterium hafniense* strain TCE1 towards organohalide respiration with tetrachloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.* 17: 6121-6127.
- Escalante-Semerena JC (2007).** Conversion of cobinamide into adenosylcobamide in bacteria and archaea. *J. Bacteriol.* 189: 4555-4560
- Ferrey ML, Wilkin RT, Ford RG, Wilson JT (2004).** Nonbiological removal of *cis*-dichloroethylene and 1,1-dichloroethylene in aquifer sediment containing magnetite. *Environ. Sci. Technol.* 15: 1746-1752.
- Fetzner S (1998).** Bacterial dehalogenation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 633-657
- Fink AL (1998).** Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold. Des.* 3: R9-R23.
- Fogel MM, Taddeo AR, Fogel S (1986).** Biodegradation of chlorinated ethenes by a methane-utilizing mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 720-724.
- Fujimoto K (1997).** SDS-digested freeze-fracture replica labeling electron microscopy to study the two-dimensional distribution of integral membrane proteins and phospholipids in biomembranes: practical procedure, interpretation and application. *Histochem. Cell Biol.* 107: 87-96
- Furukawa K, Suyama A, Tsuboi Y, Futagami T, Goto M (2005).** Biochemical and molecular characterization of a tetrachloroethene dechlorinating *Desulfitobacterium* sp. strain Y51: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32: 534-541.
- Futagami T, Tsuboi Y, Suyama A, Goto M, Furukawa K (2006).** Emergence of two types of nondechlorinating variants in the tetrachloroethene-halo-respiring *Desulfitobacterium* sp. strain Y51. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70: 720-728.
- Futagami T, Goto M, Furukawa K (2008).** Biochemical and Genetic Bases of Dehalorespiration. *The Chemical Record* 8: 1-12.
- Gallo S, Oberhuber M, Sigel RK, Kräutler B (2008).** The corrin moiety of coenzyme B<sub>12</sub> is the determinant for switching the *btuB* riboswitch of *E. coli*. *Chembiochem.* 9: 1408-1414.
- Gefahrstoffinformationssystem (GESTIS) (2012).** Institut für Arbeitsschutz der deutschen gesetzlichen Unfallversicherung. Bearbeitungsstand 17.12.2012.
- Gharahdaghi F, Weinberg CR, Meagher DA, Imai BS, Mische SM (1999).** Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis.* 20: 601-605.
- Gillham RW, O'Hannesin SF (1994).** Enhanced degradation of halogenated aliphatics by zero-valent iron. *Ground Water* 32: 958-967.
- Glover JR, Lindquist S (1998).** Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 94: 73-82.

- Gribble GW (1998).** Naturally Occurring Organohalogen Compounds. *Accounts Chem. Res.* 31: 141-152.
- Gribble GW (2003).** The diversity of naturally produced organohalogens. *Chemosphere.* 52: 289-297.
- Gribble GW (2012).** Occurrence of halogenated alkaloids. The Alkaloids: Chemistry and Biology. Editor: Hans-Joachim Knölker. *Academic Press* 71: 1-165.
- He Q, Sanford RA (2002).** Induction characteristics of reductive dehalogenation in the ortho-halophenol-respiring bacterium, *Anaeromyxobacter dehalogenans*. *Biodegradation.* 13: 307-316
- He J, Holmrd VF, Lee PK, Alvarez-Cohen L (2007).** Influence of vitamin B<sub>12</sub> and cocultures on the growth of *Dehalococcoides* isolates in defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 2847-2853.
- Hinz D (2007).** Untersuchungen zur Lokalisation und zur Expression der PCE-Dehalogenase in *Desulfitobacterium hafniense* PCE-S. Diplomarbeit. Friedrich-Schiller-Universität. Jena
- Hirokawa T, Boon-Chieng S (1998).** SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14: 378-379.
- Hofmann K, Stoffel W (1993).** TMBASE – a database of membrane spanning protein segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374: 166.
- Holliger C, Hahn D, Harmsen H, Ludwig W, Schumacher W, Tindall B, Vazquez F, Weiss N, Zehnder AJ (1998).** *Dehalobacter restrictus* gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloroethene in an anaerobic respiration. *Arch. Microbiol.* 169: 313-321.
- Holliger C, Wohlfarth G, Diekert G (1999).** Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 383-398.
- Hörber C, Christiansen N, Arvin E & Ahring BK (1998).** Improved dechlorinating performance of upflow anaerobic sludge blanket reactors by incorporation of *Dehalospirillum multivorans* into granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1860-1863.
- Jehmlich N, Schmidt F, von Bergen M, Richnow HH, Vogt C (2008).** Protein-based stable isotope probing (Protein-SIP) reveals active species within anoxic mixed cultures. *ISME J.* 2: 1122-1133.
- John M, Schmitz RPH, Diekert G (2006).** Growth substrate dependent localization of tetrachloroethene reductive dehalogenase in *Sulfurospirillum multivorans*. *Arch. Microbiol.* 186: 99-106.
- John M (2007).** Untersuchungen zur Lokalisation und Expression der PCE-Dehalogenase in *Sulfurospirillum multivorans*. Dissertation. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- John M, Rubick R, Schmitz RPH, Rakoczy J, Schubert T, Diekert G (2009).** Retentive memory of bacteria: long-term regulation of dehalorespiration in *Sulfurospirillum multivorans*. *J. Bacteriol.* 191: 1650-1655.

- Jongbloed JD, Grieger U, Antelmann H, Hecker M, Nijland R, Bron S, van Dijk JM (2004).** Two minimal Tat translocases in *Bacillus*. *Mol. Microbiol.* 54:1319-1325.
- Juteau P, Beaudet R, McSween G, Lépine F, Milot S, Bisailon JG (1995).** Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol by a methanogenic consortium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 218-224.
- Kao CM, Huang KD, Wang JY, Chen TY, Chien HY (2008).** Application of potassium permanganate as an oxidant for in situ oxidation of trichloroethylene-contaminated groundwater: A laboratory and kinetics study. *J. Hazard. Mater.* 153: 919-927.
- Kim SH, Harzman C, Davis JK, Hutcheson R, Broderick JB, Marsh TL, Tiedje JM (2012).** Genome sequence of *Desulfitobacterium hafniense* DCB-2, a gram-positive anaerobe capable of dehalogenation and metal reduction. *BMC Microbiol.* 12: 21.
- Kräutler B, Fieber W, Ostermann S, Fasching M, Ongania KH, Gruber K, Kratky C, Mikl C, Siebert A, Diekert (2003).** The cofactor of tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans* is norpseudob<sub>12</sub>, a new type of a natural corrinoid. *Helv. Chim. Acta* 86: 3698-3716.
- Kriegman-King MR, Reinhard M (1994).** Transformation of carbon tetrachloride by pyrite in aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.* 28: 692-700.
- Kyte J, Doolittle RF (1982).** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.
- Laemmli UK (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Lanthier M, Juteau P, Lépine F, Beaudet R, Villemur R (2005).** *Desulfitobacterium hafniense* is present in a high proportion within the biofilms of a high-performance pentachlorophenol-degrading, methanogenic fixed-film reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1058-1065.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ und Higgins DG (2007).** ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Levy C, Pike K, Heyes DJ, Joyce MG, Gabor K, Smidt H, van der Oost J, Leys D (2008).** Molecular basis of halo-respiration control by CprK, a CPR-FNR type transcriptional regulator. *Mol. Microbiol.* 70: 151-167.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods* 25: 402-408.
- Loessner I, Dietrich K, Dittrich D, Hacker J, Ziebuhr W (2002).** Transposase-dependent formation of circular IS256 derivatives in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 184: 4709-4714.

- Maillard J, Schumacher W, Vazquez F, Regeard C, Hagen WR, Holliger C (2003).** Characterization of the corrinoid iron-sulfur protein tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Dehalobacter restrictus*. *App. Environ. Microbiol.* 69: 4628-4638.
- Maillard J, Regeard C, Holliger C (2005).** Isolation and characterization of Tn-Dha1, a transposon containing the tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium hafniense* strain TCE-1. *Environ. Microbiol.* 7: 107-117.
- Maillard J, Genevaux P, Holliger C (2011).** Redundancy and specificity of multiple trigger factor chaperones in *Desulfitobacteria*. *Microbiology* 157: 2410-2421.
- Masek T, Vopalaensky V, Ssuchomelova P, Pospisek M (2005).** Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Anal. Biochem.* 336: 46-50.
- Matheson LJ, Tratnyek PG (1994).** Reductive dehalogenation of chlorinated methanes by iron metal. *Environ. Sci. Technol.* 28: 2045-2053.
- Maymó-Gatell X, Chien Y, Gossett JM, Zinder SH (1997).** Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science.* 276: 1568-1571.
- Maymó-Gatell X, Anguish T, Zinder SH (1999).** Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1,2-dichloroethane by *Dehalococcoides ethenogenes* 195. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3108-3113.
- Miller E, Wohlfarth G, Diekert G (1997).** Comparative studies on tetrachloroethene reductive dechlorination mediated by *Desulfitobacterium* sp. strain PCE-S. *Arch. Microbiol.* 168: 513-519.
- Mogk A, Haslberger T, Tessarz P, Bukau B (2008).** Common and specific mechanisms of AAA+ proteins involved in protein quality control. *Biochem. Soc. Trans.* 36: 120-125.
- Möller S, Croning MDR, Apweiler R (2001).** Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* 17: 646-653.
- Morita Y, Futagami T, Goto M, Furukawa K (2009).** Functional characterization of the trigger factor protein PceT of the tetrachloroethene-dechlorinating *Desulfitobacterium hafniense* Y51. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83: 775-781.
- Nahvi A, Sudarsan N, Ebert MS, Zou X, Brown KL, Breaker RR (2002).** Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chem. Bio.* 9: 1043-1049.
- Neumann A, Scholz-Muramatsu H, Diekert G (1994).** Tetrachloroethene metabolism of *Dehalospirillum multivorans*. *Arch. Microbiol.* 162: 295-301.
- Neumann A, Wohlfarth G, Diekert G. (1996).** Purification and characterization of tetrachloroethene reductive dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*. *J. Biol. Chem.* 271: 16515-16519.
- Neumann A, Wohlfarth G, Diekert G (1998).** Tetrachloroethene dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*: cloning, sequencing of the encoding genes, and expression of the *pceA* gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180: 4140-4145.

- Nijenhuis I, Zinder SH (2005).** Characterization of hydrogenase and reductive dehalogenase activities of *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1664-1667.
- Nonaka H, Keresztes G, Shinoda Y, Ikenaga Y, Abe M, Naito K, Inatomi K, Furukawa K, Inui M, Yukawa H (2006).** Complete genome sequence of the dehalorespiring bacterium *Desulfitobacterium hafniense* Y51 and comparison with *Dehalococcoides ethenogenes* 195. *J. Bacteriol.* 188: 2262-2274.
- Nudler E, Mironov AS (2004).** The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 29: 11-17.
- Peng X, Yamamoto S, Vertès AA, Keresztes G, Inatomi K, Inui M, Yukawa H (2012).** Global transcriptome analysis of the tetrachloroethene-dechlorinating bacterium *Desulfitobacterium hafniense* Y51 in the presence of various electron donors and terminal electron acceptors. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39: 255-269.
- Pop SM, Kolarik RJ, Ragsdale SW (2004).** Regulation of anaerobic dehalorespiration by the transcriptional activator CprK. *J. Biol. Chem.* 279: 49910-49918.
- Puyol D, Rajhi H, Mohedano AF, Rodríguez JJ, Sanz JL (2011).** Anaerobic biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol in expanded granular sludge bed and fluidized bed biofilm reactors bioaugmented with *Desulfitobacterium* spp. *Water Sci. Technol.* 64: 293-299.
- Rakoczy J (2007).** Induzierbarkeit der PCE-Dehalogenase in *Sulfurospirillum multivorans*. Diplomarbeit. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Ramakrishnan V (2002).** Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* 1008: 557-572.
- Rasmussen RA, Khalil MA, Dalluge RW, Penkett SA, Jones B (1982).** Carbonyl Sulfide and Carbon Disulfide from the Eruptions of Mount St. Helens. *Science.* 215: 665-667.
- Reinhold A (2008).** Untersuchungen zur Regulation und Lokalisation der PCE-Dehalogenase in *Desulfitobacterium hafniense* Stamm PCE-S und *Desulfitobacterium hafniense* Stamm Y51. Diplomarbeit. Friedrich Schiller-Universität Jena.
- Reinhold A, Westermann M, Seifert J, von Bergen M, Schubert T, Diekert G (2012).** Impact of vitamin B<sub>12</sub> on formation of the tetrachloroethene reductive dehalogenase in *Desulfitobacterium hafniense* strain Y51. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 8025-8032.
- Rodionov DA, Vitreschak AG, Mironov AA, Gelfand MS (2003).** Comparative genomics of the vitamin B<sub>12</sub> metabolism and regulation in prokaryotes. *J. Biol. Chem.* 278: 41148-41159.
- Rubick Raffael (2010).** Untersuchungen zum Einfluss von Redoxpotential und alternativen Elektronenakzeptoren als Umweltfaktoren auf die reduktive Dehalogenierung von Tetrachlorethen in *Sulfurospirillum multivorans*. Dissertation. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Sanford RA, Cole JR, Tidjei JM (2002).** Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halorespiring facultative anaerobic myxobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 893-900.

- Santini C, Bérengère I, Chanal A, Müller M, Giordano G, Wu L (1998).** A novel Sec-independent periplasm protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *The EMBO J.* 17: 101-112.
- Sargent F, Bogsch EG, Stanley NR, Wexler M, Robinson C, Berks B, Palmer T (1998).** Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J.* 17: 3640-3650.
- Saunders NFW, Houben ENG, Koefoed S, de Weerd S, Reijnders WNM, Westerhoff HV, De Boer APN (1999).** Transcription regulation of the *nir* gene cluster encoding nitrite reductase of *Paracoccus denitrificans* involves NNR and NirI, a novel type of membrane protein. *Mol. Microbiol.* 34: 24-36.
- Schägger H (2006).** Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* 1: 16-22.
- Schlieker C, Bukau B, Mogk A (2002).** Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperons in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *J. Biotechnol.* 96: 13-21.
- Schlörmann W, John M, Steiniger F, Westermann M, Richter W (2007).** Improved antigen retrieval in freeze-fracture cytochemistry by evaporation of carbon as first replication layer. *Histochem. Cell Biol.* 127: 633-639.
- Scholz-Muramatsu H, Neumann A, Meßmer M, Moore E, Diekert G (1995).** Isolation and characterization of *Dehalospirillum multivorans* gen. nov., sp. nov., a tetrachloroethene-utilizing, strictly anaerobic bacterium. *Arch. Microbiol.* 163: 48-56.
- Schneider TD, Stephens RM (1990).** Sequence Logos: A new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res.* 18: 6097-6100.
- Schumacher W, Holliger C (1996).** The proton/electron ratio of the menaquinone-dependent electron transport from dihydrogen to tetrachloroethene in "*Dehalobacter restrictus*". *J. Bacteriol.* 178: 2328-2333.
- Scott JM (1999).** Folate and Vitamin B<sub>12</sub>. *Proc. Nutr. Soc.* 58: 441-448.
- Severs NJ (2007).** Freeze-fracture electron microscopy. *Nature Protocols.* 2: 547-576.
- Siebert A (2002).** Norpseudovitamin B<sub>12</sub>: ein neuartiger Corrinoid-Kofaktor aus der reduktiven PCE-Dehalogenase von *Dehalospirillum multivorans*. Dissertation. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Siebert A, Neumann A, Schubert T, Diekert G (2002).** A non-dechlorinating strain of *Dehalospirillum multivorans*: evidence for a key role of the corrinoid cofactor in the synthesis of an active tetrachloroethene dehalogenase. *Arch. Microbiol.* 178: 443-449.
- Smidt H, van Leest M, van der Oost J, de Vos WM (2000).** Transcriptional regulation of the *cpr* gene cluster in ortho-chlorophenol-respiring *Desulfitobacterium dehalogenans*. *J. Bacteriol.* 182: 5683-5691.
- Smidt H, de Vos WM (2004).** Anaerobic microbial dehalogenation. *Annu. Rev. Microbiol.* 58:43-73.

- Sonnhammer ELL, Heijne Gv (1998).** A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* AAAI Press, Montreal, Canada: 176-182.
- Stockholmer Konvention (2009).** Stockholm Convention on persistent organic pollutants (POPs). Fourth Conference of Parties, Mai 2009.
- Stupperich E, Steiner I, Ruhlemann M (1986).** Isolation and analysis of bacterial cobamides by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 155, 365-370.
- Stupperich E, Eisinger HJ, Kräutler B (1989).** Identification of phenolyl cobamide from homoacetogenic bacterium *Sporomusa ovata*. *Eur. J. Biochem.* 186: 657-661.
- Sturm A, Schierhorn A, Lindenstrauss U, Lilie H, Brüser T (2006).** YcdB from *Escherichia coli* reveals a novel class of tat-dependently translocated hemoproteins. *J. Biol. Chem.* 281: 13972-13978.
- Sung Y, Ritalahti KM, Sanford RA, Urbance JW, Flynn SJ, James M, Tiedje JM, Löffler FE (2003).** Characterization of two tetrachloroethene reducing, acetate-oxidizing anaerobic bacteria and their description as *Desulfuromonas michiganensis* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2964-2974.
- Sung Y, Fletcher KE, Ritalahti KM, Apkarian RP, Ramos-Hernández N, Sanford RA, Mesbah NM, Löffler FE (2006).** *Geobacter lovleyi* sp. nov. strain SZ, a novel metal-reducing and tetrachloroethene-dechlorinating bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2775-2782.
- Suyama A, Iwakiri R, Kai K, Tokunaga T, Sera N, Furukawa K (2001).** Isolation and characterization of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51 capable of efficient dehalogenation of tetrachloroethene and polychloroethanes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 1474-1481.
- Suyama A, Yamashita M, Yoshino S, Furukawa K (2002).** Molecular characterization of the PceA reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51. *J. Bacteriol.* 184: 3419-3425.
- Taga ME, Walker GC (2008).** Pseudo-B<sub>12</sub> joins the cofactor family. *J. Bacteriol.* 190: 1157-1159.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011).** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- Tartakovsky B, Levesque MJ, Dumortier R, Beaudet R & Guiot SR (1999).** Biodegradation of pentachlorophenol in a continuous anaerobic reactor augmented with *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4357-4362.
- Thomas G, Potter, Cole JA (1999).** The periplasmic nitrate reductase from *Escherichia coli*: a heterodimeric molybdoprotein with a double-arginine signal sequence and an unusual leader peptide cleavage site. *FEMS Microbiol. Lett.* 174: 167-171.
- Tobiszewski M, Namiesnik J (2012).** Abiotic degradation of chlorinated ethanes and ethenes in water. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19: 1994-2006.
- Townsend GT, Sufkita JM (1997).** Influence of sulfur oxyanions on reductive dehalogenation activities in *Desulfomonile tiedjei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3594-3599.

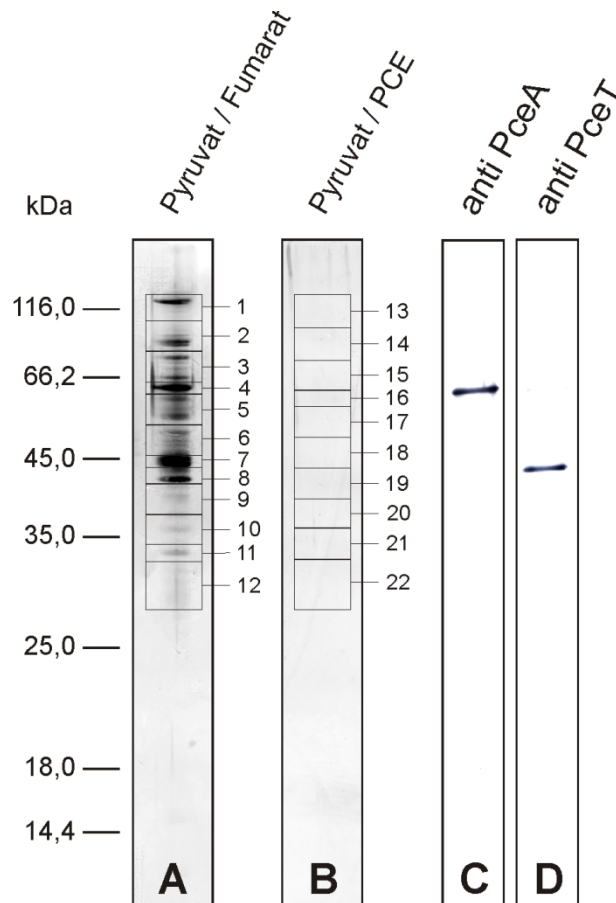
- Trinkwasserverordnung (TrinkwV) (2001).** Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch. Bundesministerium der Justiz. 21.05.2001.
- Tsukagoshi N, Ezaki S, Uenaka T, Suzuki N, Kurane R (2006).** Isolation and transcriptional analysis of novel tetrachloroethene reductive dehalogenase gene from *Desulfitobacterium* sp. strain KBC1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 543-553.
- Utkin I, Woese C, Wiegel J (1994).** Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 612-619.
- Vannelli T, Logan M, Arciero DM, Hooper AB (1990).** Degradation of halogenated aliphatic compounds by the ammonia-oxidizing bacterium nitrosomonas europaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1169-1171.
- Villemur R, Lanthier M, Beaudet R, Lépine F (2006).** The *Desulfitobacterium* genus. *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 706-733.
- Vitreschak AG, Rodionov DA, Mironov AA, Gelfand MS (2004).** Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression? *Trends Genet.* 20: 44-50.
- Vogel TM, Criddle CS, McCarty PL (1987).** Transformations of halogenated aliphatic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 21: 722-736.
- Wagner DD, Hug LA, Hatt JK, Spitzmiller MR, Padilla-Crespo E, Ritalahti KM, Edwards EA, Konstantinidis KT, Löffler FE (2012).** Genomic determinants of organohalide-respiration in *Geobacter lovleyi*, an unusual member of the Geobacteraceae. *BMC Genomics* 13: 200.
- Warren MJ, Raux E, Schubert H L, Escalante-Semerena JC (2002).** The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B<sub>12</sub>). *Nat. Prod. Rep.* 19: 390-412.
- Weiner JH, Bilous PT, Shaw GM, Lubitz SP, Frost L, Thomas GH, Cole JA, Turner R (1998).** A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. *Cell* 93: 93-101.
- Wessel D, Flügge UI (1984).** A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138: 141-143.
- World Health Organization (WHO) (2006).** Concise International Chemical Document 68, Tetrachloroethene, Genf, Schweiz.
- Wunsch P, Zumft WG (2005).** Functional domains of NosR, a novel transmembrane iron-sulfur flavoprotein necessary for nitrous oxide respiration. *J. Bacteriol.* 187: 1992-2001.
- Yi S, Seth EC, Men Y, Stabler SP, Allen RH, Alvarez-Cohen L, Taga ME (2012).** Versatility in corrinoid salvaging and remodeling pathways supports corrinoid-dependent metabolism in *Dehalococcoides mccartyi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 7745-7452.
- Zolkiewski M (1999).** ClpB cooperates with Dnak, DnaJ, and GrpE in suppressing protein aggregation. A novel multi-chaperone system from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 274: 28083-28086.



## **Anhang**

A: Massenspektrometrische Analyse der PceA-Aggregate

B: Proteinsequenzen der verwendeten RdhB-Proteine dehalogenierender Mikroorganismen



**Abbildung A-1:** SDS-PAGE der gereinigten PceA-Aggregate aus *D. hafniense* Y51 nach Dichtegradientenzentrifugation in einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten (**A**, Fraktion: 86% (w/v) Saccharose). (**B**) Kontrollversuch mit Zellen von *D. hafniense* Y51, die in Anwesenheit von PCE kultiviert wurden. Es wurde die gleiche Fraktion (86% (w/v) Saccharose) wie bei **A** aufgetragen. Die Zahlen bezeichnen die Bereiche des Gels, die ausgeschnitten und für LC/MS-Analyse verwendet wurden (siehe Tab. A-1). Es wurden jeweils 2 µl jeder Fraktion nach erfolgter Proteinfällung aufgetragen. Im Anschluss an die Elektrophorese erfolgte eine Silberfärbung der Proteine. (**C**, **D**) Immunologische Analyse der gereinigten PceA-Aggregate (Fraktion: 86% (w/v) Saccharose) mit PceA- (**C**) bzw. PceT- (**D**) spezifischen Antikörpern. Für den immunologischen Nachweis wurden 5 µl der Fraktion aufgetragen.

**Tabelle A-1:** Proteine, die mittels LC-MS/MS-Analyse in der PceA-haltigen Fraktion (Abb. A-1 A) bzw. der gleichen Fraktion des Kontrollversuches (Abb. A-1 B) nachgewiesen werden konnten. Die anschließende Analyse der detektierten Peptide erfolgte in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, September 2010). Angegeben sind die Proteinidentifikationsnummer (DSY), das Molekulargewicht, die Anzahl der gefundenen Peptide sowie der ermittelte Score-Wert und Abdeckungswert (Coverage). Die Zahlen entsprechen den in Abb. A-1 markierten Bereichen des Polyacrylamidgels.

Bande	Beschreibung	DSY	Anzahl der Peptide	Score	Coverage (%)	M <sub>r</sub> (kDa)	Accession #
1	RNA-Polymerase, $\beta$ -Untereinheit	0463	25	1115,0	23,1	125,1	gi158564292
	Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase	0115	25	1176,0	19,8	127,8	gi89892861
	RNA-Polymerase, $\beta'$ -Untereinheit	0464	13	1161,0	10,1	130,0	gi89893210
2	Elongationsfaktor G	0468	19	390,4	27,0	76,2	gi89893214
	Anaerobe Ribonukleosid-Triphosphat-Reduktase	0397	8	290,7	12,9	89,1	gi89893143
	ATP-abhängige DNA-Helikase	3891	8	0,0	11,2	86,5	gi89896637
3	Translation Elongationsfaktor	1817	18	491,6	26,8	74,0	gi89894563
	Glycyl-tRNA-Synthetase	3083	6	166,1	9,0	76,7	gi89895829
	Adenylylsulfat-Kinase/Sulfat-Adenylyltransferase, Untereinheit 1	2951	8	243,5	12,9	68,7	gi89895697
	Tetrachlorethen-Dehalogenase	2839	6	83,9	11,4	61,2	gi89895585
	Glucosamin-Fruktose-6-Phosphat-Aminotransferase	4485	4	72,9	6,6	67,4	gi89897231
4	Tetrachloroethen-Dehalogenase	2839	25	434,3	33,2	61,2	gi89895585
	L-Aspartatoxidase	0213	5	94,0	10,2	55,2	gi89892959
	Ferredoxin	2130	2	51,8	3,1	65,1	gi89894876
5	Tetrachloroethen-Dehalogenase	2839	6	133,3	13,3	61,2	gi89895585
	Cobyrsäure-Synthase	4062	3	103,5	7,8	56,6	gi89896808
	Hup-Typ Ni,Fe-Hydrogenase, große Untereinheit	1598	4	92,0	9,7	56,8	gi89894344
	ABC-Typ Transporter (Cobalt)	2723	2	73,3	4,4	65,7	gi89895469
6	Flagellinprotein	3022	8	304,0	23,9	41,0	gi89895768
	Seryl-tRNA-Synthetase	0008	7	197,6	17,1	47,9	gi89892754
	Tryptophan-Synthase, $\beta$ -Untereinheit	4462	5	90,1	12,3	50,0	gi89897208
	Homoserin-Dehydrogenase	1363	6	223,3	16,0	46,4	gi89894109
7	Elongationsfaktor Tu	0469	16	0,0	33,8	43,7	gi89893215
	Arginin-Succinate-Synthase	0785	2	0,0	6,1	45,5	gi89893531
	Flagellinprotein	3022	3	0,0	9,0	41,0	gi89895768
8	Nikotinat-Nukleotid-Dimethylbenzimidazol-Phosphoribosyltransferase (CobT)	2114	14	526,0	24,2	38,5	gi89894860
	Mutmaßlicher Trigger-Faktor	2836	1	0,0	3,2	37,0	gi58615704
	Hup-Typ Ni,Fe-Hydrogenase, kleine Untereinheit	1599	1	0,0	2,5	38,7	gi89894345
9	RecA/RadA-Rekombinase (DNA-Reparatur)	1943	7	161,9	14,7	37,0	gi89894689

Bande	Beschreibung	DSY	Anzahl der Peptide	Score	Coverage (%)	M <sub>r</sub> (Da)	Accession #
	Zellform-bestimmendes Protein MreB	3179	5	153,1	17,8	35,9	gi89895925
	ABC-Typ Transporter (Dipeptid, Oligopeptid, Nickel)	1863	7	145,0	22,7	37,4	gi89894609
	MreB-like Protein (bakterielles Cytoskelett)	4886	6	119,9	18,0	35,0	gi89897632
10	ABC-Transporter (Oligopeptid)	1862	3	69,4	11,7	36,6	gi89894608
	Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase	2500	2	59,5	8,5	36,4	gi89895246
	Glycyl-tRNA-Synthetase, Untereinheit Alpha	3084	3	24,7	9,1	34,3	gi89895830
11	30S ribosomales Protein S2	2546	15	377,6	31,2	27,6	gi89895292
	ABC-Typ Transporter (Dipeptid, Oligopeptid, Nickel)	4093	5	98,1	17,8	33,2	gi89896839
	Protein beteiligt an <i>de novo</i> Purinsynthese	0153	5	92,3	12,8	34,1	gi89892899
12	Arylamin-N-Acetyltransferase	3777	3	118,4	14,3	29,8	gi89896523
	Dissimilatorische Sulfitreduktase	2948	3	77,1	10,7	32,2	gi89895694
	Prephenat- und/oder Argonat-Dehydrogenase	2263	2	66,4	6,8	32,1	gi89895009
	Elektronentransfer Flavoprotein	1629	4	62,7	17,0	30,0	gi89894375
13	Flagellinprotein	3022	2	0,0	5,7	41,0	gi89895768
	N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidase	3329	3	0,0	2,8	117,8	gi89896075
14	Flagellinprotein	3022	5	156,2	19,8	41,0	gi89895768
	Tetrachloroethene-Dehalogenase	2839	2	43,0	4,4	61,2	gi89895585
15	Flagellinprotein	3022	4	104,8	11,1	41,0	gi89895768
	Nikotinat-Nukleotid-Dimethylbenzimidazol-Phosphoribosyltransferase (CobT)	2114	2	55,6	5,7	38,5	gi89894860
	mutmaßliche Fumaratreduktase, Flavoprotein-Untereinheit	3139	3	38,0	5,6	60,6	gi89895885
16	Flagellinprotein	3022	1	0,0	2,8	41,0	gi89895768
	Valyl-tRNA-Synthetase	3188	1	0,0	1,0	101,2	gi89895934
	ABC-Typ Transporter (Aminosäure)	4277	1	0,0	2,9	29,4	gi89897023
17	Flagellinprotein	3022	3	104,1	9,0	41,0	gi89895768
18	Flagellinprotein	3022	3	74,7	11,1	41,0	gi89895768
	N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidase	3329	6	50,0	5,4	117,8	gi89896075
19	Flagellinprotein	3022	4	158,9	14,4	41,0	gi89895768
	Nikotinat-Nukleotid-Dimethylbenzimidazol-Phosphoribosyltransferase (CobT)	2114	4	123,3	14,1	38,5	gi89894860
20	Citratlyase	1924	1	0,0	4,1	32,0	gi89894670
21	Citratlyase	1924	1	25,8	3,4	32,0	gi89894670
	Hydrolase oder Akyltransferase	3601	1	25,3	4,2	29,5	gi89896347
	mutmaßliche Fumaratreduktase, Flavoprotein-Untereinheit	2898	1	23,6	1,4	61,6	gi89895644
	ABC-Typ Transporter (Aminosäure)	4277	1	21,6	2,9	29,4	gi89897023
	Anaerobe Dehydrogenase	4614	1	20,6	3,1	25,4	gi89897360
22	-	-	-	-	-	-	-

**Tabelle B-1:** Proteinsequenzen der für die phylogenetische Analyse verwendeten RdhB-Proteine aus *D. hafniense* spec., *Sulfurospirillum* spec. *Desulfomonile tiedjei*, *Dehalobacter* spec., *Geobacter* spec., *Shewanella* spec., *Dehalococcoides* spec., *Dehalogenimonas lykanthroporepellens*, *Anaeromyxobacter* spec.

Organismus	Accession Nr.	Organismus	Accession Nr.
1 <i>D. hafniense</i> Y51	YP_519071.1	43 <i>D. mccartyi</i> 195	AAW40598.1
2 <i>Desulfitobacterium</i> sp. PCE-S	AAO60102.1	44 <i>D. mccartyi</i> 195	AAW40587.1
3 <i>Desulfitobacterium</i> sp. CR1	BAF57047.1	45 <i>D. mccartyi</i> 195	AAW40574.1
4 <i>D. dichloroeliminans</i> LMG P-21439	CAJ75431.1	46 <i>D. mccartyi</i> 195	AAW40467.1
5 <i>D. dehalogenans</i> ATCC 51507	AAD44541.1	47 <i>D. mccartyi</i> 195	AAW40372.1
6 <i>D. hafniense</i> DCB-2	ACL20647.1	48 <i>D. mccartyi</i> 195	AAW40360.1
7 <i>D. hafniense</i> DCB-2	ACL18761.1	49 <i>D. mccartyi</i> 195	AAW40355.1
8 <i>D. hafniense</i> DCB-2	ACL18752.1	50 <i>D. mccartyi</i> 195	AAW40341.1
9 <i>D. hafniense</i> DCB-2	ACL18754.1	51 <i>D. mccartyi</i> 195	AAW39613.1
10 <i>D. hafniense</i> DCB-2	ACL18774.1	52 <i>D. mccartyi</i> 195	AAW39274.1
11 <i>D. hafniense</i> DCB-2	ACL18776.1	53 <i>D. mccartyi</i> 195	AAW39263.1
12 <i>D. hafniense</i> DCB-2	ACL18800.1	54 <i>D. mccartyi</i> 195	AAW39257.1
13 <i>S. multivorans</i>	AAC60789.1	55 <i>D. mccartyi</i> 195	AAW39241.1
14 <i>S. halorespirans</i>	AAG46195.1	56 <i>D. mccartyi</i> 195	AAW39230.1
15 <i>D. tiedjei</i> DSM 6799	AFM24123.1	57 <i>D. mccartyi</i> 195	AAW39223.1
16 <i>D. tiedjei</i> DSM 6799	AFM23507.1	58 <i>D. mccartyi</i> 195	AAW39216.1
17 <i>D. restrictus</i>	CAD28791.1	59 <i>D. mccartyi</i> 195	AAW39061.1
18 <i>Dehalobacter</i> sp. WL	ACH87595.1	60 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ61254.1
19 <i>G. lovleyi</i> SZ	ACD96582.1	61 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ61260.1
20 <i>S. sediminis</i> HAW-EB3	ABV36708.1	62 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ61270.1
21 <i>S. sediminis</i> HAW-EB3	ABV36341.1	63 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ61271.1
22 <i>D. mccartyi</i> CBDB1	CAI82349.1	64 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ61276.1
23 <i>D. mccartyi</i> CBDB1	CAI83652.1	65 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ61342.1
24 <i>D. mccartyi</i> CBDB1	CAI83646.1	66 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62361.1
25 <i>D. mccartyi</i> CBDB1	CAI83643.1	67 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62363.1
26 <i>D. mccartyi</i> CBDB1	CAI83637.1	68 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62390.1
27 <i>D. mccartyi</i> CBDB1	CAI83620.1	69 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62406.1
28 <i>D. mccartyi</i> CBDB1	CAI83617.1	70 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62412.1
29 <i>D. mccartyi</i> CBDB1	CAI83611.1	71 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62414.1
30 <i>D. mccartyi</i> CBDB1	CAI83605.1	72 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62418.1
31 <i>D. mccartyi</i> CBDB1	CAI83601.1	73 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62422.1
32 <i>D. mccartyi</i> CBDB1	CAI83598.1	74 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62425.1
33 <i>D. mccartyi</i> CBDB1	CAI83593.1	75 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62427.1
34 <i>D. mccartyi</i> CBDB1	CAI83585.1	76 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62438.1
35 <i>D. mccartyi</i> CBDB1	CAI83582.1	77 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62440.1
36 <i>D. mccartyi</i> CBDB1	CAI83573.1	78 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62442.1
37 <i>D. mccartyi</i> CBDB1	CAI83569.1	79 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62447.1
38 <i>D. mccartyi</i> CBDB1	CAI83565.1	80 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62451.1
39 <i>D. mccartyi</i> CBDB1	CAI83562.1	81 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62458.1
40 <i>D. mccartyi</i> CBDB1	CAI83559.1	82 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62462.1
41 <i>D. mccartyi</i> CBDB1	CAI83530.1	83 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62469.1
42 <i>D. mccartyi</i> 195	AAW40600.1	84 <i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62473.1

	Organismus	Accession Nr.
85	<i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62476.1
86	<i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62481.1
87	<i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62485.1
88	<i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62491.1
89	<i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62497.1
90	<i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62500.1
91	<i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62519.1
92	<i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62525.1
93	<i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62528.1
94	<i>D. mccartyi</i> VS	ACZ62534.1
95	<i>P. profundum</i> 3TCK	EAS45660.1
96	<i>D. lykanthroporepellens</i> BL-DC-9	ADJ26808.1
97	<i>D. lykanthroporepellens</i> BL-DC-9	ADJ26787.1
98	<i>D. lykanthroporepellens</i> BL-DC-9	ADJ26447.1
99	<i>D. lykanthroporepellens</i> BL-DC-9	ADJ26815.1
100	<i>D. lykanthroporepellens</i> BL-DC-9	ADJ25600.1
101	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-1	ACL63713.1
102	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-C	ABC80106.1
103	<i>Anaeromyxobacter</i> sp. K	ACG71584.1
104	<i>D. mccartyi</i> BAV1	ABQ16694.1
105	<i>D. mccartyi</i> BAV1	ABQ16702.1
106	<i>D. mccartyi</i> BAV1	ABQ16711.1
107	<i>D. mccartyi</i> BAV1	ABQ16713.1
108	<i>D. mccartyi</i> BAV1	ABQ16763.1
109	<i>D. mccartyi</i> BAV1	ABQ16864.1

	Organismus	Accession Nr.
110	<i>D. mccartyi</i> BAV1	ABQ16869.1
111	<i>D. mccartyi</i> BAV1	ABQ16870.1
112	<i>D. mccartyi</i> BAV1	ABQ16883.1
113	<i>D. mccartyi</i> BAV1	ABQ17569.1
114	<i>D. mccartyi</i> BAV1	ABQ16709.1
115	<i>D. mccartyi</i> GT	ADC74631.1
116	<i>D. mccartyi</i> GT	ADC73491.1
117	<i>D. mccartyi</i> GT	ADC73609.1
118	<i>D. mccartyi</i> GT	ADC74547.1
119	<i>D. mccartyi</i> GT	ADC74549.1
120	<i>D. mccartyi</i> GT	ADC74595.1
121	<i>D. mccartyi</i> GT	ADC74628.1
122	<i>D. mccartyi</i> GT	ADC74640.1
123	<i>D. mccartyi</i> GT	ADC74642.1
124	<i>D. mccartyi</i> GT	ADC74650.1
125	<i>D. mccartyi</i> GT	ADC74654.1
126	<i>D. mccartyi</i> GT	ADC74657.1
127	<i>D. mccartyi</i> GT	ADC74661.1
128	<i>D. mccartyi</i> GT	ADC74666.1
129	<i>D. mccartyi</i> GT	ADC74672.1
130	<i>D. mccartyi</i> GT	ADC74675.1
131	<i>D. mccartyi</i> GT	ADC74692.1
132	<i>D. mccartyi</i> GT	ADC74698.1
133	<i>D. mccartyi</i> GT	ADC74701.1
134	<i>D. mccartyi</i> GT	ADC74707.1

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir bei der Bearbeitung der Doktorarbeit stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Frau Prof. Dr. Gabriele Diekert möchte ich für Bereitstellung des interessanten Themas meiner Dissertation und die stete Diskussionsbereitschaft danken.

Für die engagierte Betreuung meiner Doktorarbeit, die fachlichen Diskussionen sowie die vielen hilfreichen Ratschläge und Anregungen gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Torsten Schubert.

Herrn Dr. Martin Westermann danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit und Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen, sowie für die immerwährende Diskussionsbereitschaft.

Für ihre stete Hilfsbereitschaft und moralische Unterstützung, vor allem während des Verfassens der Dissertation, danke ich Frau Dr. Sandra Studenik.

Für die sehr gute Zusammenarbeit und die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen möchte ich zudem Frau Dr. Jana Seifert und Herrn Dr. Martin von Bergen des Umweltforschungszentrums (UFZ) Leipzig danken.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Dr. Taiki Futagami und Prof. Dr. Kensuke Furukawa für die Bereitstellung der verwendeten Antikörper und der LD-Variante von *D. hafniense* Y51.

Ein ganz großes Dankeschön gilt den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Angewandte und Ökologische Mikrobiologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft.

Meiner Familie und Freunden danke ich für die moralische Unterstützung und das aufgebrachte Verständnis. Vielen Dank an Euch!

*„Leider läßt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.“*

*(Johann Wolfgang von Goethe)*

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit bestätige ich, Anika Reinhold, geboren am 10.10.1984 in Gera, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist. Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt außer den angegebenen keine Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen oder Quellen verwendet. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen. Es wurden von mir keine geldwerten Leistungen erbracht, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Diese Dissertation wurde nur dem Fakultätsrat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena und keiner anderen Hochschule zur wissenschaftliche Prüfung oder Dissertation vorgelegt. Diese Arbeit ist weder identisch noch teildentisch mit einer Arbeit, welche an der Friedrich-Schiller-Universität Jena oder einer anderen Hochschule zur Dissertation eingereicht worden ist.

Anika Reinhold

Jena, den .....



## Curriculum Vitae

Name Anika Reinhold  
Geburtsdatum 10. 10. 1984  
Geburtsort Gera

### Schulbildung

1991 - 1995 13. Grundschule Gera  
1995 - 2003 Karl-Theodor-Liebe-Gymnasium Gera  
06/2003 Abitur

### Studium

10/2003 – 01/2009 Biologie-Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Diplomarbeit am Lehrstuhl für Angewandte und Ökologische  
Mikrobiologie mit dem Thema: „Untersuchungen zur Regulation und  
Lokalisation der PCE-Dehalogenase in *Desulfotobacterium hafniense*  
Stamm PCE-S und *Desulfotobacterium hafniense* Stamm Y51“

### Berufliche Tätigkeit

11/2006 - 01/2007 Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Angewandte und Ökologische  
Mikrobiologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Tutorium für Mikrogenphysiologie  
04/2007 - 06/2007 studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Angewandte und Ökologische  
Mikrobiologie (Labortätigkeit)  
07/2007 - 09/2007 studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Angewandte und Ökologische  
Mikrobiologie (Labortätigkeit)  
10/2007 - 01/2008 Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Angewandte und Ökologische  
Mikrobiologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Tutorium für Mikrogenphysiologie  
Seit 01/2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorandin) am Lehrstuhl für  
Angewandte und Ökologische Mikrobiologie, Friedrich-Schiller-  
Universität Jena

Jena, den .....

## Wissenschaftliche Veröffentlichungen

**Anika Reinhold\*, Martin Westermann\*, Jana Seifert, Martin von Bergen, Torsten Schubert, Gabriele Diekert (2012).** Impact of vitamin B<sub>12</sub> on formation of the tetrachloroethene reductive dehalogenase in *Desulfitobacterium hafniense* strain Y51. *Applied and Environmental Microbiology* (78): 8025-8032.

(\* geteilte Erstautorenschaft)

**Anika Reinhold, Martin Westermann, Taiki Futagami, Torsten Schubert, Gabriele Diekert.** Formation and subcellular localization of the PceB protein in the tetrachloroethene dechlorinating *Desulfitobacterium hafniense* strain Y51.

- In Vorbereitung

## Vorträge im Rahmen von wissenschaftlichen Tagungen

**2011                      Characterization of PCE dehalogenase aggregates in cells of *Desulfitoabcterium hafniense* Y51 cultivated in the absence of PCE**

**Anika Reinhold**, Martin Westermann, Taiki Futagami, Kensuke Furukawa, Jana Seifert, Martin van Bergen, Torsten Schubert, Gabriele Diekert  
*Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)*, Karlsruhe

## Poster im Rahmen von wissenschaftlichen Tagungen

**2009                      The impact of chlorinated ethenes on the formation and subcellular localization of the tetrachloroethene reductive dehalogenase in *Desulfitobacteria* strains**

**Anika Reinhold**, Martin Westermann, Torsten Schubert, Gabriele Diekert  
*Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)*, Bochum

- 2009**      **Subcellular localization of the tetrachloroethene reductive dehalogenase in *Desulfitobacterium hafniense* strains**
- Martin Westermann, Renate Kaiser, Anika Reinhold, Torsten Schubert, Gabriele Diekert  
*Microscopy Conference*, Graz
- 2010**      **Subcellular localization of the tetrachloroethene reductive dehalogenase (PceA) and the proteins PceB and PceT in *Desulfitobacterium hafniense* Y51**
- Anika Reinhold, Martin Westermann, Taiki Futagami, Kensuke Furukawa, Torsten Schubert, Gabriele Diekert  
*Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)*, Hannover
- 2012**      **Reductive dechlorination in *Desulfitobacterium hafniense* Y51: Impact of vitamin B<sub>12</sub> on *pceA* gene stability and expression**
- Anika Reinhold, Torsten Schubert, and Gabriele Diekert  
*Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)*, Tübingen